

Aus dem Medizinischen Zentrum für operative Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. med. Fuchs-Winkelmann  
Institut für experimentelle Orthopädie und Biomechanik  
Leitung: Prof. Dr. David B. Jones

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

**Aktivitätsverhalten von ERK1 und 2 in  
MG-63 Osteosarkomzellen unter dem Einfluss von  
Inhibitoren bei mechanischer Belastung**

Inaugural-Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt im Mai 2006 von

**Cornelia Westrich**

aus Warmbronn

der Philipps-Universität Marburg

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. David B. Jones

Korreferentin: Prof. Dr. med. Steininger

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
2.1	Knochengewebe.....	9
2.2	Knochenzellen.....	9
2.3	Regulation des Knochenbaus.....	10
2.4	Umbau des Knochens.....	11
2.5	Mechanotransduktion.....	11
2.6	Signalproteine.....	18
2.6.1	MAP-Kinasen.....	18
2.6.1.1	ERK.....	18
2.6.2	ProteinkinaseC.....	19
2.6.2.1	Struktur der PKC.....	20
2.6.2.2	Regulierung der PKC.....	21
2.6.2.2.1	Regulierung der PKC durch Phosphorylierung.....	22
2.6.2.2.2	Regulierung der PKC durch Pseudosubstrat.....	22
2.6.2.2.3	Autophosphorylierung der PKC.....	22
2.6.3	Phospholipase C.....	23
2.6.4	Ras.....	24
2.6.5	Raf.....	25
2.6.5.1	Paradoxe Aktivierung.....	25
2.7	Signalkaskaden.....	26
2.7.1	MAP-Kinasen-Signalkaskaden.....	26
2.7.1.1	ERK1/2-Signalkaskade.....	28
2.7.1.1.1	ERK1/2-Aktivierung anderer Zellen.....	31
2.7.1.2	SAPK/JNK-Signalkaskade.....	32
2.7.1.3	p38 MAP-Kinase-Signalkaskade.....	34
2.7.1.4	Paradoxe Aktivierung.....	34
2.7.2	JAK/STAT-Weg.....	36
2.7.3	Integrine.....	37
2.7.4	MAP-Kinase-Kaskade in Osteoblasten.....	37
2.8	Klinische Relevanz.....	38
2.9	Zielsetzung der Arbeit.....	38

<b>3</b>	<b>Material.....</b>	<b>40</b>
3.1	Chemikalien.....	40
3.2	Lösungen und Puffer.....	41
3.3	Zelllinien.....	43
3.4	Nährmedium.....	43
3.5	Aktivatoren.....	43
3.6	Inhibitoren.....	43
3.7	Antikörper.....	44
3.8	Geräte.....	44
3.9	Sonstige Materialien.....	44
<b>4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>45</b>
4.1	Zellkultur.....	45
4.1.1	<i>Humane MG-63 Osteosarkomzellen.....</i>	<i>45</i>
4.1.2	<i>Splitten der Zellen.....</i>	<i>45</i>
4.1.3	<i>Einfrieren von Zellen.....</i>	<i>46</i>
4.1.4	<i>Passagieren von Zellen auf Dehnungsplatten.....</i>	<i>46</i>
4.2	Dehnungsexperimente.....	47
4.2.1	Grundlagen.....	47
4.2.2	Polykarbonatplatten.....	48
4.2.3	Dehnungsapparatur.....	49
4.2.4	MTT-Zellproliferationsassay.....	51
4.3	Gelelektrophorese und Immunoblot.....	52
4.3.1	Lysieren von Zellen.....	52
4.3.2	Bradford-Assay.....	53
4.3.2.1	Grundlagen.....	53
4.3.2.2	Versuchsdurchführung.....	54
4.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	55
4.3.3.1	Grundlagen.....	55
4.3.3.2	Herstellung von Trenngel und Sammelgel.....	56
4.3.3.3	Elektrophorese.....	57
4.3.4	Western Blotting.....	59
4.3.4.1	Grundlagen.....	59
4.3.4.2	Durchführung.....	59
4.3.5	Nachweis von ERK1/2.....	61
4.3.5.1	Grundlagen.....	61
4.3.5.2	Durchführung.....	63



4.3.5.2.1	<i>Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen.....</i>	63
4.3.5.2.2	<i>Primärantikörper.....</i>	63
4.3.5.2.3	<i>Sekundärantikörper.....</i>	64
4.3.5.2.4	<i>Colorimetrischer Nachweis der alkalischen Phosphatase.....</i>	64
4.4	Aktivatoren und Inhibitoren.....	65
4.4.1	Effekt von TPA.....	66
4.4.2	Effekt von BAPTA AM.....	66
4.4.3	Effekt von Gö 6976.....	67
4.4.4	Effekt von Gö 6983.....	67
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>68</b>
5.1	MTT-Zellproliferationsassay.....	68
5.1.1	Grundlagen.....	68
5.1.2	Ergebnisse.....	68
5.2	Mechanische Dehnung von MG-63 Osteosarkomzellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten.....	71
5.2.1	Aktivierung von ERK1/2 durch mechanische Dehnung.....	72
5.3	Versuche mit BAPTA AM.....	75
5.3.1	Aktivierung von ERK1/2 durch BAPTA AM in nicht gedehnten Zellen.....	75
5.3.2	Dehnungsversuch mit BAPTA AM.....	76
5.4	Versuche mit Gö 6976.....	77
5.4.1	Stimulierender Effekt von Gö 6976 auf ERK1/2 in nicht gedehnten Zellen.....	77
5.4.2	Dehnungsversuch mit Gö 6976.....	78
5.5	Versuche mit Gö 6983.....	79
5.5.1	Stimulierender Effekt von Gö 6983 auf ERK1/2 in nicht gedehnten Zellen.....	79
5.5.2	Dehnungsversuche mit Gö 6983.....	80
5.5.2.1	Dehnung der 6. Zellpassage.....	80
5.5.2.2	Dehnung der 9. Zellpassage.....	81
5.6	Ergebniszusammenfassung.....	82
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>105</b>

## 1 Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AK	Antikörper
ASK	apoptosis signal-regulating kinase
BAPTA AM	bis-Aminobromophenoxyethan-Tetraessigsäure-Tetraacetoxymethylester
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	bovine serum albumin
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular regulated kinase
FCS	fetal calf serum
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanindiphosphat
Grb2	growth factor receptor bound protein-2
GTP	Guanintriphosphat
Gö 6976	12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indol[2,3-a]pyrrol[3,4-c]-carbazol
Gö 6983	2-(1H-indol-3-yl)-3-[1-(3-dimethylaminpropyl)-1H-indol-3-yl-]maleinimid
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-jun N-terminal kinase
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase

---

MAP-KKK	MAP-Kinase Kinase Kinase
MEK	mitogen activated ERK activating kinase
MEKK	MEK-Kinase
MLK	mixed lineage kinase
MTK	three kinase for mitogen activated protein kinase kinase kinase
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered salt buffer
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	eine MAP-KKK
SAPK	stress activated protein kinase
SDS	Sodium-dodecylsulfat
SERCA	sarco-/endoplasmatic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
Sos	Son of Sevenless (ein GEF, der erstmals im Drosophila Gen sev beschrieben wurde)
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAK	transforming growth factor beta activated kinase
TBS	Tris buffered salt buffer
TBST	Tris buffered salt buffer-Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 2 Einleitung

Fast alle Zellen, Prokaryonten, Eukaryonten und Pflanzen reagieren auf mechanische Reize mit elektrophysiologischer und/oder biochemischer Antwort. Für Zellen ist es wichtig, sich an die Umgebung mit ihren mechanischen Reizen anzupassen, um so das Gewebe durch Auf- und Abbau im Gleichgewicht zu halten. Das betrifft im Besonderen Zellen des Skelettsystems, Herzmuskels, der Blutgefäße, des Knochens, der Haut und des Lungenepithels (Jones, 1994).

Bereits 1869 legte der Chirurg Julius Wolff „Das Gesetz der Transformation der Knochen“ fest, welches den Knochenbau je nach mechanischer Belastung mathematisch beschreiben kann (Wolff, 1994). Der Knochen reagiert auf physiologische Belastung mit vermehrter Dicke der Kortikalis, vermehrter Anzahl und Dicke der Trabekel, Erhöhung der Mineraliendichte, Umbau der Knochenstruktur und Änderung der Proteoglykane. Die Knochenmasse und -struktur hängen somit von den an sie gestellten mechanischen Anforderungen ab. Dieses Prinzip der Anpassung nennt sich Wolff'sches Gesetz (Jones, 1994). Bei verminderter Belastung, z. B. bei längerer Ruhigstellung oder bei längerem Aufenthalt unter Schwerelosigkeit zeigt sich klinisch eine Abnahme der Knochenmasse mit daraus resultierender Osteoporose (Sobotta, 1991).

## 2.1 Knochengewebe

Knochengewebe ist ein spezialisiertes Bindegewebe mit Stützfunktion, welches 99% des Calciums speichert, hohe Zug- und Druckfestigkeit und eine gewisse Elastizität besitzt. Es ist aufgrund des ständigen Auf- und Abbaus der Knochensubstanz ein dynamisches Material. Die Interzellulärsubstanz besteht aus etwa 25% organischen und 50% anorganischen Bestandteilen sowie zu 25% aus Hydratationswasser. Die organische Substanz wird auch als Knochenmatrix bezeichnet und besteht zu 90-95% aus Kollagenfasern des Typ 1 Kollagen. Bei dem Rest handelt es sich um Knochenproteine wie Osteonectin, -pontin, -kalcin, Glykosaminoglykane, Knochensialoprotein und Thrombospondin. Osteonectin verbindet die Mineralien des Knochens mit Kollagen, Osteopontin mit den Zellen. Anorganische Verbindungen sind Mineralien wie anorganisches Phosphat (50%), Calcium (35%), Citrat, Carbonat, Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenstoffe. Calciumphosphat liegt in kristalliner Form als Hydroxylapatit vor und durch Anlagerung an Kollagen beginnt die Mineralisierung des Knochens. Die Oberfläche des Hydroxylapatit ist von einem Hydratmantel umgeben, der für den Ionenaustausch zwischen den Kristallen und der Umgebung wichtig ist, vor allem spielt es eine wichtige Rolle bei der Einlagerung und Mobilisierung von Calcium (Junqueira, 4. Aufl.), (Sobotta 1991).

## 2.2 Knochenzellen

Es gibt 4 verschiedene Knochenzelltypen:

- Osteoprogenitorzellen (Vorläuferzellen der Osteoblasten)
- Osteoblasten
- Osteozyten
- Osteoklasten

**Osteoblasten** synthetisieren die Knochenmatrix, die in noch nicht verkalkter Form Osteoid genannt wird. Sie sind aber auch am Knochenabbau beteiligt, indem sie das an der Matrixoberfläche liegende Osteoid abbauen und so für die Osteoblasten den Weg zur verkalkten Matrix frei machen.

**Osteocyten** gehen aus Osteoblasten hervor, welche ganz von Interzellulärsubstanz umgeben sind und der Erhaltung des Knochens dienen.

**Osteoklasten** entstehen aus Knochenmarkvorläuferzellen, die mit Vorläuferzellen der Monocyten und Makrophagen verwandt sind und die Interzellulärsubstanz abbauen. Vitamin D beeinflusst deren Differenzierung zu Osteoklasten. Calcitonin hemmt die Osteoklastenaktivität, wohingegen Parathormon und bestimmte Zytokine die Osteoklasten aktivieren. (Junqueira 4. Aufl.), (Sobotta 1991).

## 2.3 Regulation des Knochenbaus

Proteine, Vitamine und Hormone regulieren den Knochenumbau. Bei unzureichender Proteinzufuhr kommt es infolge Aminosäuremangels zu Störung der Kollagensynthese, für die ebenfalls Vitamin C wichtig ist. Vitamin A hat Einfluß auf die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten und stellt so ein Gleichgewicht her zwischen Auf- und Abbau des Knochens. Eine schädliche Wirkung zeigt sich bei einem Überschuß an Vitamin A, da es die Ossifikation der Wachstumsfugen beschleunigt. Vitamin D ist wichtig für die Calciumresorption, wobei ein Mangel durch verzögerte Verkalkung der Knochenmatrix zu Rachitis und ein Vitaminüberschuß zu vermehrter Knochenresorption führt. Parathormon ist der Gegenspieler zu Calcitonin und baut im Gegensatz zu Calcitonin Knochen ab. Somatotropes Hormon steigert die Osteoblastenaktivität und die Aufnahme der Aminosäuren in die Zellen (Junqueira 4. Aufl.), (Sobotta 1991).

## 2.4 Umbau des Knochens

Je nach Druck-, Zug-, Dehnungs- und Bieungskräften passt sich der Knochen durch entsprechenden Verlauf der Spongiosabälkchen in den Hauptspannungslinien (Trajektorien) und Verlaufsrichtung der Kollagenfasern in den Lamellen an, wodurch ihm dort eine erhöhte Festigkeit verliehen wird. Es findet ein ständiger Umbau des Knochens statt, vor allem dort, wo sich Kräfte ändern (Sobotta 1991).

## 2.5 Mechanotransduktion

Signaltransduktion nennt man den Vorgang, durch welche eine Zelle auf einen extrazellulären Reiz antwortet, welcher durch mechanische Stimulierung, Hormone und Wachstumsfaktoren verursacht wird. Mechanische Reize werden durch Dehnung, Schwerkraft, Windkraft, Vibration, hydrostatische Kräfte oder durch die eigene Bewegung selbst ausgelöst. Im Falle der Mechanotransduktion ist der Stimulus ein mechanischer Reiz.

Die Zellantwort ist abhängig von der Frequenz und Stärke des Reizes.

Für schwache Reize hat die Natur Sensoren entwickelt, die beispielsweise im Gleichgewichtsorgan und in der Schwimmblase des Fisches zu finden sind und Zilien, die als Sensoren des Gleichgewichtsorgans den Reiz verstärken (Jones, 1994/1995).

Knochenzellen können mit Dehnungen bis zu 0,5%, eher 0,3% mechanisch belastet werden ehe das Gewebe bricht. Haut- und Muskelzellen können dagegen bis zu 150% mechanisch gedehnt werden (Jones, 1994/1995). Aufgrund der Steifheit des Knochengewebes können Osteoblasten unter physiologischer Dehnung zwischen 5-40nm gedehnt werden (Jones, 1991). Auf physiologische Belastungen reagiert der Knochen mit vermehrter Dicke der Kortikalis, vermehrter Anzahl und Dicke der Trabekel, Erhöhung der

Mineraliendichte, Umbau der Knochenstruktur und Änderung der Proteoglykane. Die Knochenmasse und -struktur hängen somit von den an sie gestellten mechanischen Anforderungen ab. Dieses Prinzip der Anpassung nennt sich Wolff'sches Gesetz.

Bei Schwerelosigkeit hingegen kommt es zur Verminderung von Knochenbildung, Mineralgehalt und Knochenmatrixproteinen.

Je nach Art des Knochens, Stärke und Richtung der mechanischen Belastung kommt es zu einer unterschiedlich starken Knochendeformatität (Jones, 1994/1995), die auch von der jeweiligen Art der mechanischen Belastung, ob mechanische oder biaxiale Dehnung der Membran, hypotonische Schwellung, hydrostatischer Druck oder Flüssigkeitsbewegung (fluid shear) abhängig ist (Duncan, 1995). Gleichmaßen ist auch die Zellantwort abhängig von der Stärke, Dauer und Frequenz der Belastung, d.h. längere Dauer und geringere Belastung haben die gleiche Wirkung auf die Knochenbildung wie eine stärkere Belastung bei kürzerer Dauer (Jones, 1994/1995).

Normalerweise sind Röhrenknochen leicht gebogen, wodurch es unter Belastung immer zur Spannung der einen Seite und Kompression der gegenüberliegenden Seite des Gewebes kommt. Zwischen beiden Seiten befindet sich die neutrale Zone. Das Knochenwachstum findet aber gleichmaßen im unter Spannung stehenden, komprimierten und neutralen Gewebe statt (Jones, 1991).

**Strain S** (Dehnung ) als dimensionslose Größe ist definiert als

$$S = \frac{l' - l}{l}$$

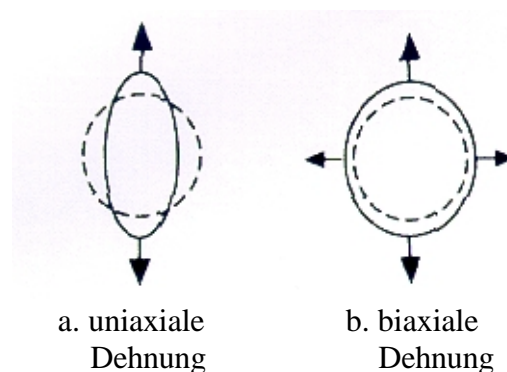
$l'$  = neue Länge

$l$  = Ausgangs- oder Ursprungslänge



Lanyon beschrieb die minimale effektive Dehnung ( $500\mu\text{str}$ ) unter der die Knochenmasse aufrechterhalten wird und die effektive Dehnung ( $1500\mu\text{str}$ ), durch welche die Masse zunimmt (Jones, 1994). Dabei stellten Lanyon und seine Kollegen fest, daß die maximale physiologische Dehnung bei gewichttragenden Knochen bei  $3000\mu\text{str}$  ist. Zur Aufrechterhaltung der Gewebemasse wird eine minimale Dehnung mit  $300\mu\text{str}$ , 20 Zyklen und 1 Hz benötigt. Bei mehr als  $1500\mu\text{str}$  steigt die Knochenmasse an. Jedoch wurden die Zellen in unphysiologischer Richtung (durch die normale neutrale Achse) gedehnt, was erklären könnte, warum  $4000\mu\text{str}$  in physiologischer Richtung Knochen stimuliert. Normalerweise werden Osteoblasten in vivo zwischen  $0-4000\mu\text{str}$  uniaxial gedehnt (Jones, 1995), wobei es jedoch unklar ist, in wieweit die biaxiale Dehnung eine Rolle spielt (Jones, 1991). Biaxiale Dehnungen zeigten bei  $300\mu\text{str}$  physiologische Antworten (Jones, 1994). Zudem muß die Dehnung zyklisch sein, um eine neue Knochenbildung bewirken zu können, die sich bei mehr als  $1000\mu\text{str}$  deutlich zeigte. Statische Dehnungen in vivo hatten keine Wirkung auf die Neubildung von Knochen.

Die Zellantwort ist der Höhe der applizierten Belastung direkt proportional (Duncan, 1995).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Zelldeformation durch uniaxiale und biaxiale Dehnung.

Osteosarkomzellen (OST, U2OS, MNNG, SOAS) sind bei 3000 $\mu$ str mechanosensitiv (Jones, 1995).

10 000 $\mu$ str statische oder 20 000 $\mu$ str dynamische Dehnung ergaben bei Osteoblasten ähnliche Antworten (Duncan, 1995). Bei 3000 $\mu$ str, 30 Zyklen (30 malige Belastung) und 1 Hz pro Tag steigt bei unter Spannung gehaltenen Osteoblasten die Zellzahl innerhalb von vier Tagen um 30% an, wobei eine Kompression dagegen nur eine Erhöhung von 5% zeigt (Jones, 1994). Bei weniger als 0,5 Hz zeigt sich in vivo keine Knochenbildung, hingegen steigt sie bei 2 Hz um das Vierfache an (Duncan, 1995). Jones et al. haben zum Vergleich keine Versuche mit niedrigeren Frequenzen oder statischen Dehnungen durchgeführt haben, weshalb es daher unklar ist, ob eine dynamische Dehnung in der Zellkultur effektiver ist (Jones, 1995).

Buckley belastete Osteoblasten mit bis zu 25 000 $\mu$ str und konnte erkennen, dass sich die Zellen in ihrer Form und Orientierung deutlich veränderten. Hyperphysiologische Dehnung von 101%, 130% und 30 Zyklen pro Tag an insgesamt fünf Tagen verursachte bei Osteoblasten Veränderungen hinsichtlich ihrer Morphologie sowie eine Zellorientierung von 90° zur Dehnungsrichtung. Stärkere Dehnungen stoppten die Osteokalzinexpression und ließen die Synthese von Kollagen Typ 3 und Glykosaminyglykanen ansteigen (Jones, 1994).

Nach 10-20min statischer Dehnung depolymerisiert die Aktinstruktur der Zelle, die sich dann 90° zur Dehnungsrichtung hin bewegt und dadurch weniger sensitiv auf die Dehnung reagiert (Jones, 1995).

Die Mechanostathypothese von Frost beschreibt ein „Fenster“ mit normaler/physiologischer Belastung, welche dann zu Knochenumbau und -bildung führt, wenn jene Belastung die minimal effektive (*minimum effective strain*) des „physiologischen Fensters“ überschreitet.

Das Model der Anpassung von Knochengewebe, welches Mechanokopplung, biochemische Kopplung, Signalübertragung und Zellantwort beinhaltet, an mechanische Belastung ist dem des Gefäßendothels vergleichbar, wobei hier die Blutströmung als *fluid shear*

stress auf die Gefäßendothelzellen wirkt. Durch die hohe Blutfließgeschwindigkeit produzieren die Zellen einen Parakrinfaktor, durch welchen die glatten Gefäßmuskelzellen relaxieren und die Fließgeschwindigkeit des Blutes gedrosselt wird (Duncan, 1995).

Im Knochen gibt es vier Abschnitte der Mechanotransduktion:

1. Mechanokopplung
2. Biochemische Kopplung
3. Signalübertragung
4. Zellantwort

### **1. Mechanokopplung**

Durch Biegungskräfte kommt es auf einer Seite des Knochens zur Dehnung des Gewebes und auf der anderen Seite zur Kompression, wodurch hierbei ein sog. *poisson's effect* entsteht, so dass es in der interstitiellen Flüssigkeit zu Druckdifferenzen kommt und die Flüssigkeit in den Teil des Gewebes fließt, das unter Dehnung steht. Es ist dabei nicht klar, ob die mechanische Dehnung oder die Flüssigkeitsbewegung den stärkeren Einfluss auf die Zellantwort hat.

Flüssigkeitsbewegungen verursachen elektrische Felder (*streaming potentials*), die direkt auf Knochenzellen wirken können. Zudem ist bekannt, dass applizierte elektromagnetische Felder die Knochenresorption hemmen und die Knochenbildung stimulieren können (Duncan, 1995).

### **2. Biochemische Kopplung**

Der Reiz wird durch die extrazelluläre Matrix-Integrin-Zytoskelett-Kaskade, aktive Kationen-Kanäle, G-Proteine, das Zytoskelett, durch die PLC und PLA weitergeleitet, wobei die Kaskaden miteinander verknüpft sind.

Integrine sind zellmembranspannende Glykoproteine, die durch Vinculin,

Talin, Tensin und  $\alpha$ -Aktinin mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung stehen und durch welche die Zelle an die extrazelluläre Matrix bindet. Somit besteht eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zellkern. Durch das Zytoskelett bauen die Zellen eine innere Kraft auf und halten die extrazelluläre Matrix gespannt, damit ein physikalischer Reiz schnell zum Zellkern fortgeleitet werden kann. Scheinbar ist die Änderung des Zytoskeletts durch mechanische Stimulierung auf die veränderte Genexpression zurückzuführen.

Ein durch Flüssigkeitsströmung verursachter Stress (*fluid shear stress*) lässt Endothelzellen parallel zur Fließrichtung aneinanderreihen und vermehrt Aktinfilamentstressfasern bilden, die sich ebenfalls in Zugrichtung anordnen. Interessanterweise bewegen sich auf Silikon-Kulturplatten gewachsene Endothelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten senkrecht zur Zugrichtung, wenn sie durch zyklische biaxiale Dehnung deformiert werden (Duncan, 1995).

Signalkaskaden sind eng miteinander verknüpft und je nach mechanischem Reiz resultieren unterschiedliche Zellantworten. Beispielsweise werden in durch Flüssigkeitsströmung gedehnte Osteoblasten Kationen-Kanäle oder G-Proteine aktiviert. Biaxiale Dehnung stimuliert das Integrin-Zytoskelett-Netzwerk (Duncan, 1995).

### **3. Signalübertragung**

Aktive Osteoblasten, Osteocyten und *bone-lining*-Zellen nehmen als Sensor mechanische Signale auf und leiten diese mit Hilfe von Gap-junctions und parakrinen Faktoren weiter. Durch parakrine Faktoren differenzieren sich Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten (Duncan, 1995). Gap-junctions dienen Osteoblasten der Kommunikation untereinander, können dadurch jedes Mal 50% des elektrophysiologischen Signals reduzieren und so die Signale im Gewebe koordinieren (Jones, 1994). Aktive Osteoblasten (5% d. Knochenoberfläche) aber vor allem *bone-lining*-Zellen (94% d. Knochenoberfläche) und Osteocyten (1% d. Knochenoberfläche) sind die

mechanosensitiven Zellen. *Bone-lining*-Zellen und Osteocyten sind nichtproliferative Zellen, die keine Knochensubstanz produzieren (Duncan, 1995).

Nach mechanischer Dehnung von Osteoblasten der Rattentibia kommt es zum Anstieg von Osteoprogenitorzellen, die sich nach 48-72h zu Osteoblasten differenzieren, nachdem sie zur Knochenoberfläche (Kortikalis) gewandert sind. Endokortikale Osteoblasten stammen von proliferierenden und nichtproliferierenden Vorläuferzellen ab. 48h nach mechanischer Dehnung stammen mehr als 95% der Osteoblasten von nichtproliferierenden Zellen ab, wohingegen nach 96 Std. 30-40% der Osteoblasten von proliferierenden Osteoprogenitorzellen abstammen.

5min nach Dehnung zeigen die Osteoblasten einen Anstieg von cAMP, wobei der zur cAMP-Aktivierung führende genaue Mechanismus nicht bekannt ist, jedoch Brüche des Zytoskeletts einen Anstieg von cAMP erzeugen. Osteocyten und Osteoblasten kommunizieren über Parakrine miteinander, durch welche nach mechanischer Dehnung vermehrt IGF-1 synthetisiert wird und nachfolgend Kollagen Typ 1 und Osteocalcin ansteigen. IGF-1 stimuliert die Bildung der Knochenmatrix und Knochenproliferation bei Ratten. IGF-2 wird durch niederfrequente elektrische Felder stimuliert und könnte so auch eine Rolle spielen. Parakrine wie PGE<sub>2</sub> und Prostacyclin werden durch mechanische Dehnung freigesetzt. Prostacyclin erhöht IGF-2, PGE<sub>2</sub> stimuliert die Zellproliferation, die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Kollagensynthese, produziert Osteoprogenitorzellen und stimuliert deren Differenzierung (Duncan, 1995).

#### **4. Zellantwort**

Die Zellantwort erfolgt über entsprechende Signalkaskaden und beinhaltet die Proliferation und Differenzierung von Zellen, Apoptose und Entzündung.

## 2.6 Signalproteine

Signalproteine sind:

- **MAP-Kinasen**
- Proteinkinase C
- Phospholipase C
- Ras
- Raf

### 2.6.1 MAP-Kinasen

MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinase) sind:

- ERK (extracellular signal-regulated kinase)
- SAPK (stress activated protein kinase)
- p38MAPK

#### 2.6.1.1 ERK

Die Familie der ERKs besteht aus ERK1-5, deren Hauptweiterleiter eines Proliferationssignals zum Zellkern scheinbar *p44*ERK1 und *p42*ERK2 sind. ERK3 ist hauptsächlich im Zellkern „untätiger“ Zellen, wobei weder die sie aktivierenden Signale noch ihre Zielstrukturen untersucht wurden. ERK4 bleibt gleichermaßen rätselhaft, während ERK5/BMK1 (Big MAP Kinase) eine redoxensitive Kinase ist, die das Zytoskelett zum Ziel haben könnte (Hipskind, 1998).

Die relative Menge von ERK1 ist in Osteoblastenzellen von Maus und Ratte niedriger im Vergleich zu ERK2, wobei sich in menschlichen Zellen ein deutlich größerer Unterschied zeigt. Die Grundaktivität von ERK2 ist in HOB (normal human osteoblastic cells), HBMS (normal human bone marrow stromal cells) und TE-85 Zellen größer, wohingegen in MG-63 Zellen eine sehr geringe oder keine beobachtet wird. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch

*in-gel MAP kinase*- und Immunkomplex-Kinasen-Assays mit sehr niedriger oder nicht nachweisbarer ERK1-Grundaktivität im Vergleich zu ERK2. Dies läßt stark darauf schließen, daß ERK1/2 eine niedrige Grundaktivität haben und durch extrazellulären Stimulus stark aktiviert werden, wobei die Grundaktivität und Stärke der Aktivierung von den Wachstumsfaktoren des Zelltyps abhängig sind. Gesammelte Daten weisen darauf hin, daß die geringere Stabilität und relativ geringere Menge von ERK1 für die schwache Aktivierung oder Nichtaktivierung, die in *in-gel MAP kinase assays* beobachtet wurde, verantwortlich gemacht werden könnten. ERK1 denaturiert nicht immer vollständig und ist weniger stabil als ERK2, wobei der Stabilitätsgrad im Gel auch vom Zelltyp abhängig ist. Demnach kann das *in-gel MAP kinase assay* keine genaue Messung der ERK1-Aktivität liefern (Chaudhary, 1997).

### 2.6.2 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) ist eine Serin-/Threonin-Kinase, welche durch extra- und intrazelluläre Signale aktiviert wird und eine wesentliche Rolle in der Signalkaskade, im Zellwachstum, der Transkription, Immunantwort, im Umgestalten des Aktinzytoskeletts, der Apoptose, Mitose, Zellproliferation, Thrombozytenaktivierung, Anpassung der Ionenkanäle und Sekretion spielt. Die PKC ist der Hauptrezeptor für tumorfördernde Phorbolster und wird durch DAG,  $\text{Ca}^{2+}$  und den Kofaktor Phosphatidylserin (PS) aktiviert. Von der PKC gibt es 11 Isoformen, die in drei Familien mit jeweils unterschiedlichen Eigenschaften aufgrund ihrer Struktur und Kofaktorregulation unterteilt werden. Zu nennen sind die Familien cPKCs (conventional), nPKCs (novel) und aPKCs (atypical). Außerdem gibt es eine eccentric PKC ( $\text{PKC}_{\mu}$ , auch bekannt als PKD) und PKC-related Kinasen (=PRK, PRK1-3), welche auch unter dem Namen PKN bekannt sind. Zu cPKCs gehören die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\gamma$ , zu den nPKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , und  $\theta$ , zu den aPKCs  $\zeta$  und  $\lambda$  und zur eccentric PKC die  $\text{PKC}_{\mu}$ . cPKCs und nPKCs werden durch DAG und den

Kofaktor PS aktiviert, wobei die Aktivierung der cPKC  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist. aPKCs und PKC $_{\mu}$  sind  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig und benötigen nur PS als Kofaktor (Toker, 1998).

Familie	Isoform	$\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit
<i>conventional</i> cPKC	$\alpha, \beta_{1+2}, \gamma$	Ja
<i>novel</i> nPKC	$\delta, \varepsilon, \eta, \theta$	Nein
<i>atypical</i> aPKC	$\xi, \lambda$	Nein
<i>eccentric</i> PKC	$\mu$	Nein

### 2.6.2.1 Struktur der PKC

Die PKC besitzt eine N-terminal regulatorische und C-terminal katalytische Region sowie eine autoinhibitorische Pseudosubstratsequenz, eine C1- und C2-Domäne, eine ATP- und Substratbindungsstelle. Die C1-Domäne hat eine DAG- und Phorbolsterbindungsstelle, die Pseudosubstratsequenz dient der Autoinhibition und die C2-Domäne der Erkennung von Fettsäuren und kann bei manchen Isoformen Calcium binden. ATP und Substrat werden an die C3- und C4-Domänen gebunden. nPKCs sind den cPKCs in ihrer Struktur sehr ähnlich, sie besitzen aber im Gegensatz zu ihnen eine C2-Domäne mit zu wenig Fettsäuren, um Calcium binden zu können und sind daher calciumunabhängig; aPKCs dahingegen haben eine deutlich unterschiedliche Struktur, keine Bindungsstelle für Phorbolster und eine C1-Domäne mit nur einer cysteinreichen Region (Newton, Biol.Chem., 1995).



### 2.6.2.2 Regulierung der PKC

Aktivierung der PLC bewirkt eine Hydrolyse von membranständigen Inositolphospholipiden und damit die Bildung von DAG und Inositolphosphaten wie  $IP_3$ , welches intrazelluläres  $Ca^{2+}$  freisetzt. Produkte der  $IP_3$ , PtdIns-3,4-P2 und PtdIns-3,4-5-P3, aktivieren nPKCs und aPKCs aber auch  $IP_3$  selbst kann die PKC aktivieren.

Alle PKCs haben eine N-terminale Pseudosubstratdomäne (PS), die für die Autoinhibition verantwortlich ist und an die substratbindende Tasche des inaktiven Moleküls bindet. DAG und Phorbolster wie TPA binden an die C1-Domäne, es kommt zur verminderten Autoinhibition und damit zur Aktivierung und Phosphorylierung von Substraten.  $Ca^{2+}$  und PS wirken beide auf DAG oder TPA und bewirken so eine außergewöhnliche Affinitätswechselwirkung zwischen PKC und Membran. Auch Lipide mit cis-ungesättigten Fettsäuren (meist Arachnoidinsäure) können durch Steigerung der Wirkung von DAG bei basaler  $Ca^{2+}$ -Konzentration PKC aktivieren. Ceramide aktivieren aPKCs und die verwandte Raf-1 Kinase. PDK-1 (phosphoinositide- dependent kinase-1) ist die PKC-*upstream* Kinase und bindet an PtdIns-3,4-P2 und PtdIns-3,4-5-P3 mit dadurch folgender Translokation an die Membran. Die katalytische Domäne der PKC besitzt drei Threonin „Schlüssel“-Reste (Thr 500, 410 und 505), die wahrscheinlich Hauptort der Phosphorylierung sind und eine Aktivierung der PKC bewirken. PKCzeta und  $\lambda$  haben einen Glutaminrest mit phosphorylierender Wirkung und besitzen daher eine hohe basale Aktivität. In unstimulierten Zellen sind mindestens 50% der Thr-Reste der cPKC $\beta_2$  phosphoryliert, wobei PDK-1 cPKCs in unstimulierten Zellen phosphorylieren. Im Gegensatz dazu werden aPKCs durch Thr-Reste durch PDK-1 *mitogen*-abhängig phosphoryliert. PDK-1 besitzt intrinsische Aktivität, die sich scheinbar nicht durch gleichgerichtet wirkende Stimulation ändert und Hauptaktivator der cPKCs ( $\alpha$ ,  $\beta_2$ ) in unstimulierten Zellen ist. PKCzeta kann nur durch Zellstimulation phosphoryliert werden (Toker, 1998).

Die Aktivierung der PKC erfolgt zunächst durch eine Phosphorylierung der

Aktivierungsschleife der PKC und anschließend durch eine Ablösung des Pseudosubstrats von seiner Bindungsstelle (Newton, 1995).

#### **2.6.2.2.1 Regulierung der PKC durch Phosphorylierung**

Zunächst liegt die PKC als inaktive dephosphorylierte Vorläuferform vor, welche an eine vorübergehende Phosphor-Form und schließlich an eine endgültige "reife" Form gebunden wird.

Eine Phosphorylierung der Aktivierungsschleife bewirkt eine Aneinanderreihung dieser Kinaseformen und zwei Autophosphorylierungen der C-terminalen Region, so daß die "reife" PKC ins Cytoplasma gelangt. Erst wenn sich das Pseudosubstrat aus seiner Bindung löst, wird die PKC aktiv. DAG bindet an die C1- und PS an die C2-Domäne, womit es zur Translokation an die Membran kommt (Newton, 1995).

#### **2.6.2.2.2 Regulierung der PKC durch Pseudosubstrat**

Nach Aktivierung der PKC durch DAG, Calcium, Phosphatidylserin (Pseudosubstrat/PS, welches an der substratbindenden Stelle bindet) oder kofaktorunabhängige Substrate wie Protamin kommt es zur Ablösung des Pseudosubstrats von der PKC. Durch Bindung von DAG und Phorbol ester an die C1-Domäne ändert sich dessen hydrophobe Oberfläche, so dass die PKC zur Membran gelangen kann. Calcium erhöht die Affinität negativ geladener Fettsäuren cPKCs (Newton, 1995).

#### **2.6.2.2.3 Autophosphorylierung der PKC**

Autophosphorylierung der PKC dient allein einem Regulationsmechanismus zur Kontrolle der PKC und könnte physiologisch die Aufgabe haben, durch Änderung der Enzymaktivität die Substratkonzentration begrenzt zu halten. Durch eine Intrapeptidreaktion könnte die PKC autophosphoryliert und als aktivierte Form dann verändert und vielleicht herunterreguliert werden, womit der PKC eine bemerkenswerte Flexibilität verliehen wird. Eine auf diese Weise veränderte PKC kann somit auf andere Signale antworten. Nachdem

die regulatorische und katalytische Domäne verändert wird, scheint die Intraeptidphosphorylierung ihnen eine bemerkenswerte Flexibilität zu verleihen. Kovalente Änderung durch verändertes Intraeptid erweist sich als allgemeines Phänomen der Enzymregulation (Newton, 1987).

Nur die membrangebundene PKC (Huang, 1986), deren regulatorische hydrophobe Domäne mit der Membran Wechselwirkungen eingeht (Mochly-Rosen, 1987), kann autophosphorylieren. Wahrscheinlich steigern die signalinduzierte Abnahme von Inositolphospholipiden, durch welche DAG entsteht, und tumorfördernde Phorbol-diester die Autophosphorylierung der PKC. Um ihren aktiven Zustand aufrechtzuerhalten, erhöht sich ihre Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  und Phorbol-diester, was eine Voraussetzung für die Signalamplifikation verschiedener Stimuli sein könnte (Huang, 1986). Eine Hemmung der hydrophoben Domäne kann durch  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipid ausgelöst werden (Mochly-Rosen, 1987). Autophosphorylierungen konnten auch bei der Insulin-Rezeptor/-Kinase, EGF-Rezeptor/-Kinase und den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen nachgewiesen werden (Huang, 1986).

### 2.6.3 Phospholipase C

Physiologische Dehnung von Osteoblasten stimuliert direkt  $\text{PLC}\gamma\text{-1}$ , die dann durch  $\text{IP}_3$  eine intrazelluläre Calciumfreisetzung bewirkt und durch DAG die PKC aktiviert. IFC (intracellular free calcium) aktiviert Kaliumkanäle, wodurch das Membranpotential steigt (Jones, 1991).

Säugetiere besitzen drei Hauptklassen der PLC, dies sind die  $\text{PLC}\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Sie benötigen für ihre Aktivität Calcium, hydrolysieren  $\text{PIP}_2$  und erzeugen die Substrate DAG und  $\text{IP}_3$ , DAG aktiviert PKC, während  $\text{IP}_3$  die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht. Die Aktivierung der PLC kann über zwei Wege induziert werden, wobei die Isoform  $\beta$  über mit Transmembranrezeptoren kommunizierende G-Proteine und  $\gamma$  durch Transmembranrezeptoren mit

intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität aktiviert wird (Essen, 1996).

IP<sub>3</sub> setzt Ca<sup>2+</sup> aus seinen Speicherorganen, dem endoplasmatischen Reticulum, frei. Hingegen sind für den extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom spannungsabhängige oder ligandengesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle der Membran verantwortlich.

Örtliche oder zeitliche Änderungen der Calciumkonzentration dienen auf vielen Signalwegen als Elemente der intrazellulären Signalleitung (Krauss, 1997).

#### 2.6.4 Ras

Ras ist eine guaninnukleotidbindende GTPase zahlreicher Membranrezeptoren, einschließlich Tyrosinkinaserezeptoren und trägt zur Zellproliferation, -differenzierung und -morphologie bei. Aktivierte Ras-Onkogene wurden in verschiedenen menschlichen Tumoren einschließlich im Epithelkarzinom der Lunge, Kolon und des Pankreas gefunden.

Ras liegt in GDP-gebundener inaktiver und GTP-gebundener aktiver Form vor, dessen Umwandlung von GDP zu GTP von GEFs (guanine nucleotide exchange factors) reguliert wird. Die GTPase-Aktivierung erfolgt durch GAPs (PTPase activating proteins). Von Rezeptortyrosinkinasen, EGF- und PDGF-Rezeptoren und PKC ist Ras das *Downstream*-molekül. Tyrosinkinaserezeptoren werden durch Wachstumsfaktoren aktiviert, Sos (GEF) bindet infolgedessen an ein Adaptorprotein Grb2 und gelangt so zur Membran. Anschließend wird Ras durch Sos aktiviert, Ras aktiviert Raf und letztlich werden MAP-Kinasen aktiviert. Aktivierte Ras reagiert auch mit der IP<sub>3</sub>-Kinase, die in der Regulierung des Aktinzytoskeletts durch Wachstumsfaktoren, PDGF und EGF, mit einbezogen ist (Yamamoto, 1999).

### 2.6.5 Raf

Raf-Kinasen (MAP-Kinase-Kinase-Kinase/MAPKKK) sind Serin-/Threoninkinasen, bei denen als gewinnbringende Funktion entdeckt wurde, dass sie Zellen tumorartig umwandeln können. Sie werden durch Transmembrantytrosinkinase- (RTKs) und Zytokin-Rezeptoren über intrazelluläre Proteintyrosinkinasen (PTKs) aktiviert. RTKs und PTKs dienen in Abhängigkeit von Mitogenen als Raf-bindende Proteine (Daum, 1994). Die Familie der Rafs besteht aus c-, B- und A-Raf, wobei c-Raf der Hauptaktivator ist und B-Raf die stärkste Aktivierung der ERK-Kaskade zeigt (Hipskind, 1998). Alle Raf Proteine besitzen die Regionen CR1-3, wobei die CR1-Domäne Ras bindet (Daum, 1994). Raf ist das Substrat von Ras, durch welche Raf infolge der Wachstumsfaktor oder Onkogen vermittelten Ras-Aktivierung zur Membran transloziert und nach noch nicht ganz geklärten Mechanismen aktiviert wird. Aktivierte Raf aktiviert MEK, welche MAP-Kinasen aktiviert. Die aktivierte MAP-Kinase gelangt zum Zellkern und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren wie TCF und Jun (Yamamoto, 1999). TCF spielt in der Aktivierung von *immediate early genes* wie c-fos eine Schlüsselrolle (Hipskind, 1998), hinzu kommt, daß Raf für die Transkription von AP-1 essentiell ist. Es gibt aber auch „alternative“ MEK-Kinasen, deren MEK1 und 2 unabhängig von Raf aktiviert werden (Daum, 1994).

#### 2.6.5.1 Paradoxe Aktivierung

SB203580 ist ein Inhibitor von SAPK, p38MAPK und c-Raf. In Säugetierzellen induziert dieser Inhibitor die Aktivierung von c-Raf, was folgendermaßen erklärt werden könnte:

- c-Raf unterdrückt selbst seine Aktivität durch Feedback
- Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und c-Raf resultiert in Oligomerisierung von c-Raf oder c-Raf gelangt zur Plasmamembran (Hall-Jackson, 1999).

Menschliche monocytäre THP-1 Zellen zeigen nach Behandlung von SB203580 ebenfalls eine gesteigerte c-Raf-Aktivierung und eine Phosphorylierung von MEK1 und ERK1/2. Auch Inhibitor ZM336372 induziert die paradoxe Aktivierung von c-Raf in THP-1 Zellen. Geregelt wird die c-Raf-Aktivierung durch einen negativen Feedback-Mechanismus, durch welchen die Aktivität durch die eigene unterdrückt wird. Durchbrechen der negativen Feedback-Schleife durch Inhibitoren führt zu einem Anstieg der aktiven Form und damit zu einem bemerkenswerten Anstieg der Kinasenaktivität. Wird c-Raf durch den Feedback-Mechanismus „aktiviert“, werden durch sie MEK und schließlich ERK aktiviert (Numazawa, 2003).

## 2.7 Signalkaskaden

### 2.7.1 MAP-Kinasen-Signalkaskaden

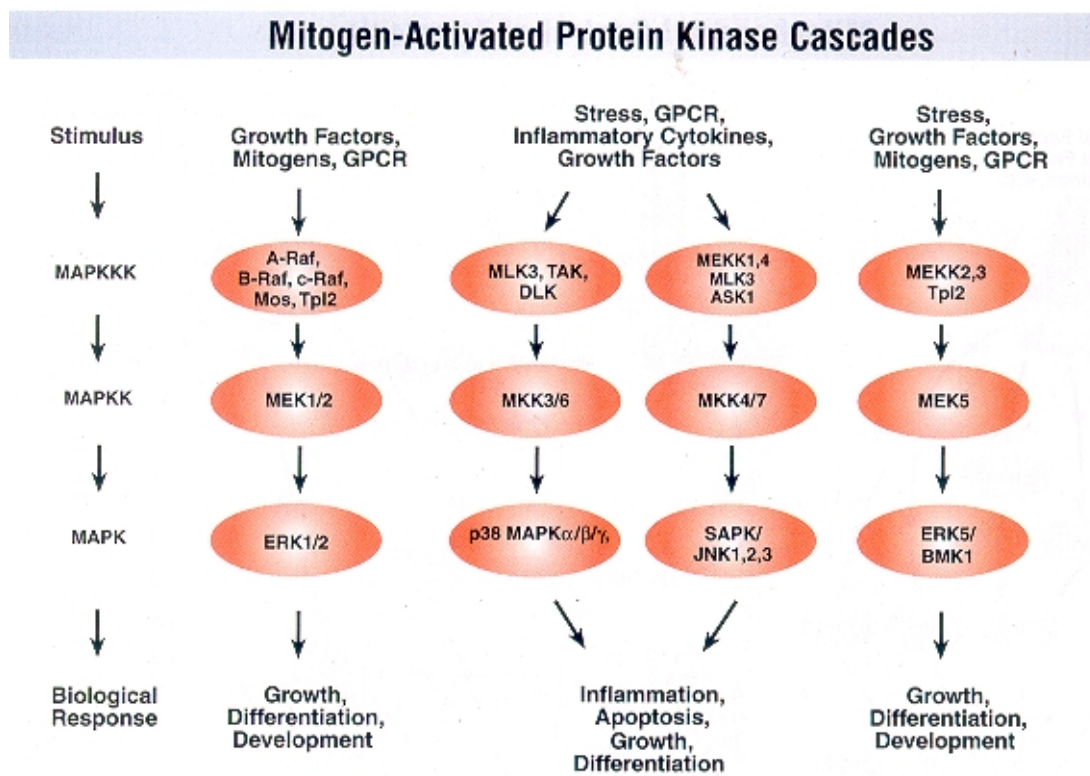
Die MAP-Kinase-Kaskade sorgt für eine Schlüsselverbindung zwischen den membrangebundenen Rezeptoren und Änderung der Genexpression. In Säugetierzellen sind drei verschiedene MAP-Kinase-Kaskaden bekannt:

- ERK-Kaskade
- SAPK/JNK-Kaskade
- p38MAPK/RK/HOG

Jede Kaskade hat je nach Zelltyp und Zusammenhang unterschiedliche Aufgaben, welche die Weiterleitung von Stress-, Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptosesignale beinhalten. Diese Kaskaden haben eine überlappende Regulation von Transkriptionsfaktoren zum Ziel, welche zur Aktivierung von *rapid response genes*, insbesondere Gene der fos- und jun-Familie der Protoonkogene führt. Diese sind die Hauptbestandteile des Transkriptionsfaktors AP-1, das eine zentrale Rolle in der Regulierung von Genen spielt, die während der Osteoblastendifferenzierung früh aktiviert

werden. Die MAP-Kinase-Kaskade besteht aus sequentiell hintereinandergeschalteten MAP-Kinasen, welche ein Signal amplifizieren und große Änderungen eines Signals bewirken können. Auf jeder Stufe der Signalkaskade ist eine positive und negative Signalregulierung möglich und trägt so dazu bei, daß es zu einer Vielzahl an Regulierungen gibt. SAPK/JNK- und p38MAPK-Kaskade wurden in Osteoblasten bisher nicht entdeckt. Untersuchungen von osteoblastenähnlichen Osteosarkomzellen zeigten durch  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 und unterschiedlichem Stress eine Induktion von SAPK/JNK (Hipskind, 1998).

MAP-Kinasen sind im Jak/STAT-Weg wichtig, da sie STAT phosphorylieren und ihnen so die volle Genaktivierung verleihen (Barinaga, 1995).



**Abb. 2.2:** zeigt die MAP-Kinase-Kaskaden, die in drei verschiedene Wege aufgeteilt werden. MAP-Kinasen sind an vielen Zellabläufen wie Zellproliferation, -differenzierung, -bewegung und -tod beteiligt.

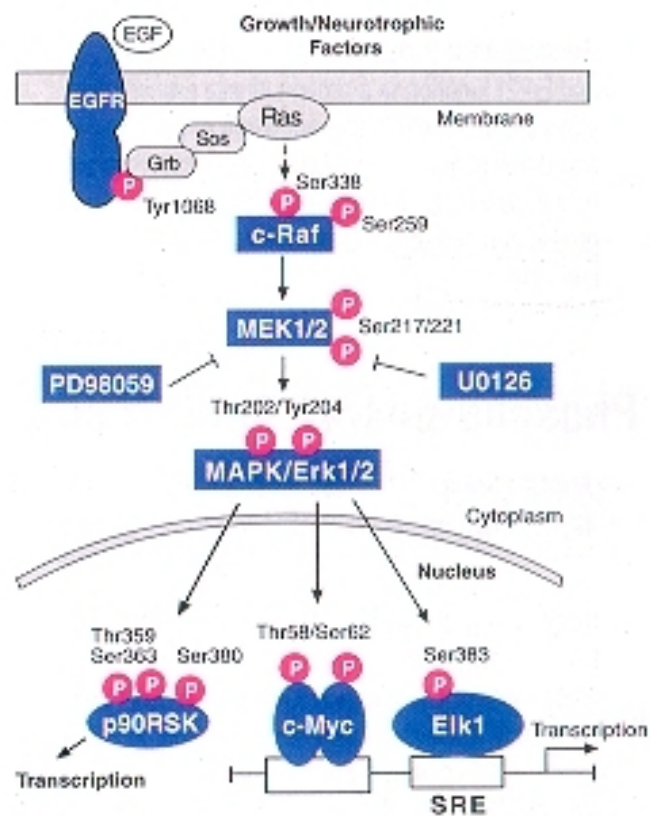
### 2.7.1.1 ERK1/2–Signalkaskade

Aktivierung der Ras-Proteine und nachfolgend der ERK-Kaskade geschieht über Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase, Rezeptor-Tyrosinkinasen und Rezeptoren mit gekoppeltem G-Protein. Aktivatoren der ERK-Kaskade sind Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), IGF (insulin like growth factor) und NGF (nerve growth factor), die an die Rezeptor-Tyrosinkinase in unterschiedlichen Zellen binden (Chaudhary, 1998).

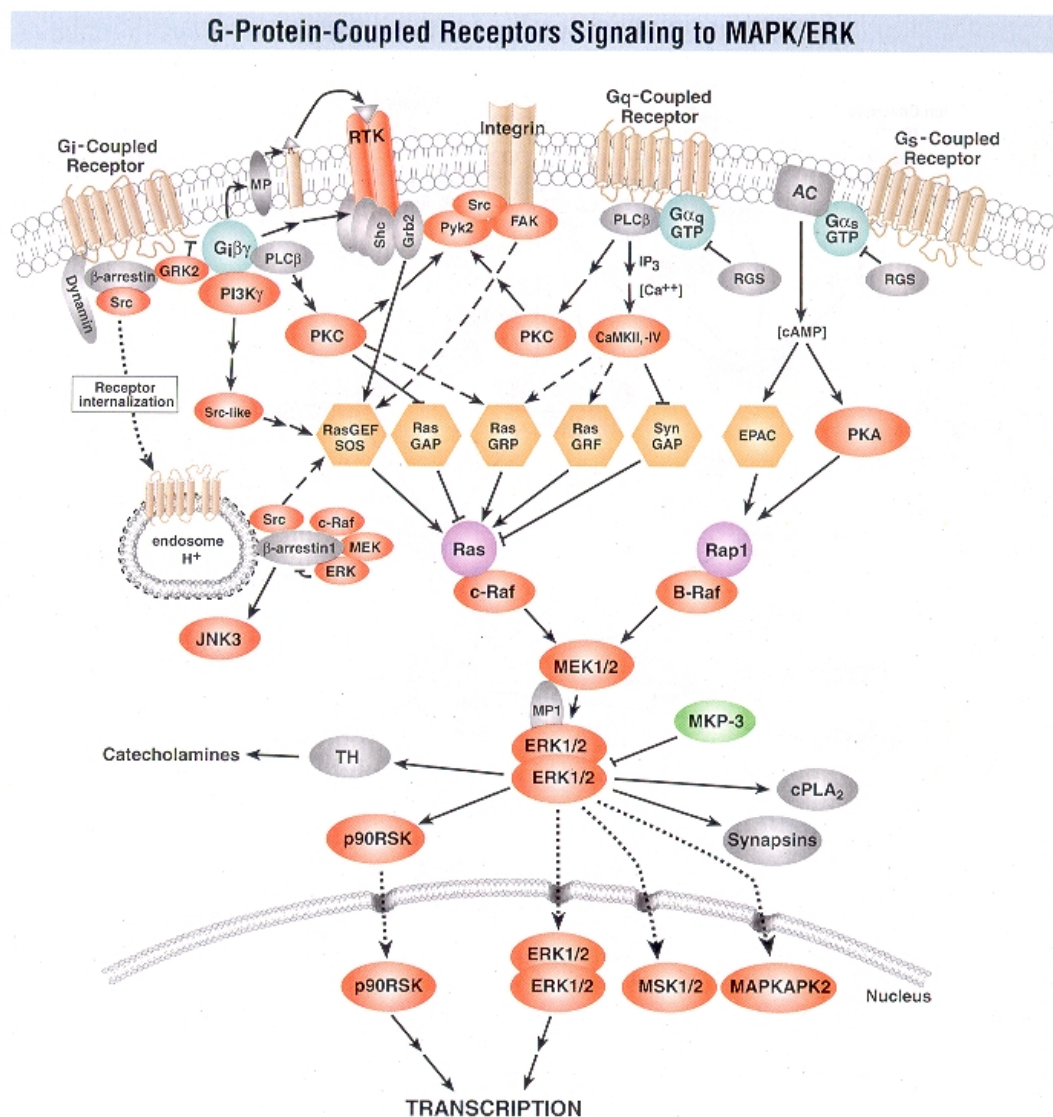
Die Reihenfolge der ERK-Kaskade ist **Ras**  $\Rightarrow$  **Raf**  $\Rightarrow$  **MEK**  $\Rightarrow$  **ERK**. MEK1 und 2 phosphorylieren Thr- und Tyr-Reste von Thr-Glu-Tyr der ERK, die dann in den Zellkern translozieren und auf Transkriptionsfaktoren und den basalen Transkriptionskomplex zielen. Eines der Hauptzielstrukturen der ERK ist TCF (namentlich ELK-1) und sein Homolog SAP-1a, welche eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung von *immediate early genes* wie c-fos haben. Die ERK-Aktivität sinkt schnell auf niedrige Werte und bleibt während der G1-Phase des Zellzyklus erhalten. ERK wird durch Dephosphorylierung u.a. durch MAP-Kinase-Phosphatase (MKP) inaktiviert und die Mehrzahl dieser Phosphatasen werden durch *immediate early genes* verschlüsselt. Dies zeigt, daß es eine Feedbackregulierung gibt, die sicherstellt, dass die ERK-Aktivierung nur kurzzeitig besteht. Trotzdem ist die Induktion der MKPs oft zu langsam, um ERK inaktivieren zu können.

Außer Transkriptionsfaktoren hat ERK noch andere zahlreiche *Downstream*-Effektoren. Zu nennen sind die Kinasen der p90RSK-Familie (ribosomal protein S6 kinase). RSK scheint mit ERK einen Komplex zu bilden und transloziert wie ERK nach Aktivierung in den Zellkern. Zellkernsubstrate der RSK-Phosphorylierung sind SRF und CREB, wodurch die ERK-Kaskade auf viele Elemente der c-fos Promotorregion gleichzeitig zielen kann (Hipskind, 1998).





**Abb. 2.3:** Der MAP-Kinasen(ERK1/2)-Signaltransduktionsweg spielt in der Regulierung von Zellwachstum und -differenzierung eine zentrale Rolle. Stimulierung durch einen Wachstumsfaktor bewirkt eine Aktivierung einer Proteinkinase-Kaskade, in der nacheinander Raf, MEK und ERK1/2 aktiviert werden. Letzteres aktiviert dann Elk1 sowie p90RSK.



**Abb. 2.4:** G-Protein gebundene Rezeptoren werden durch verschiedene äußere Stimuli aktiviert, wodurch unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden.

### 2.7.1.1.1 ERK1/2-Aktivierung anderer Zellen

Zyklische Dehnung von Endothelzellen (EC) aktiviert GDP-gebundene p21ras, die dann als aktive GTP-gebundene Form raf-1 phosphoryliert und ERK1/2 aktiviert. Die Aktivierung von ERK1/2 ist abhängig von der Tyrosinkinase, PKC, zum Teil von der IP<sub>3</sub>-Kinase und unabhängig von Calcium (Ikeda, 1999). Integrine haben dabei auch die Aufgabe der Signalübertragung.

Durch zyklische Dehnung der EC produzieren diese vermehrt Prostazyklin, Endothelin, NO und tPA, steigern deutlich ihre Proliferationsrate, werden länger und ordnen sich senkrecht zum Kraftvektor an. Ein deutlicher Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung konnte nach 5min mit einem Maximum nach 10min beobachtet werden, dabei stieg ERK1 auf Werte von 150 +/- 12%, ERK2 auf 151 +/- 25%. Die Aktivierung ist dabei sowohl von der Zeit als auch vom Ausmaß der Dehnung abhängig.

Durch *shear stress* stimulierte EC und mechanisch gedehnte Herzmuskelzellen zeigen ebenfalls nach gleicher Zeit eine Aktivierung der ERK1/2.

Eine Calciumfreisetzung durch die IP<sub>3</sub>-Kinase zeigt sich bei zyklisch gedehnten und schergestressten EC. Herzmuskelzellen demonstrieren je nach mechanischer Belastung eine teilweise calciumabhängige ERK2-Aktivierung. Die Ergebnisse zeigten das Vorhandensein verschiedener Signalkaskaden sowohl in gleichen als auch in unterschiedlichen Zelltypen (EC und Herzmuskelzellen), wobei je nach hämodynamischer Kraft (*shear stress* und zyklische Dehnung) in gleichen Zellen jeweils unterschiedliche Signalkaskaden stimuliert werden. Verschiedene Zelltypen können dabei auch auf ähnliche Kräfte wie die zyklische Dehnung durch unterschiedliche Signalkaskaden antworten. Eine zellspezifische Signalkaskade wird in Astrocyten und Gliomazellen beschrieben.

ELK-1, c-fos und c-myc werden nach zyklischer Dehnung von EC durch ERK1/2 phosphoryliert (Ikeda, 1999).

BAEC (bovine aortic endothelial cells) reagieren unter *shear stress* je nach Stärke der Scherkraft mit einem jeweils entsprechendem Anstieg von phosphorylierter ERK1/2 und auch hier ist die Aktivierung zeitabhängig. Die ERK1/2-Aktivierung zeigt sogar einen biphasischen Anstieg und benötigt im Vergleich zur JNK-Aktivierung stärkere Scherkräfte. Man nimmt an, daß der Scherkraft ausgesetzte EC je nach Änderung der Scherkraft ERK oder JNK aktivieren. Große Änderungen aktivieren ERK, kleine die JNK (Jo, 1997).

Zwerchfellmuskulatur reagiert auf mechanischen Stress mit einer Aktivierung von ERK1/2 und auch hier ist das Ausmaß der Aktivierung abhängig von der Art der Dehnung, d.h. ob die Dehnungsrichtung axial oder quer zu den Zellen ist. Deutlich stärkere Phosphorylierung der ERK1/2 ergab eine Dehnung quer zu den Muskelfasern (Kumar, 2002).

#### **2.7.1.2 SAPK/JNK –Signalkaskade**

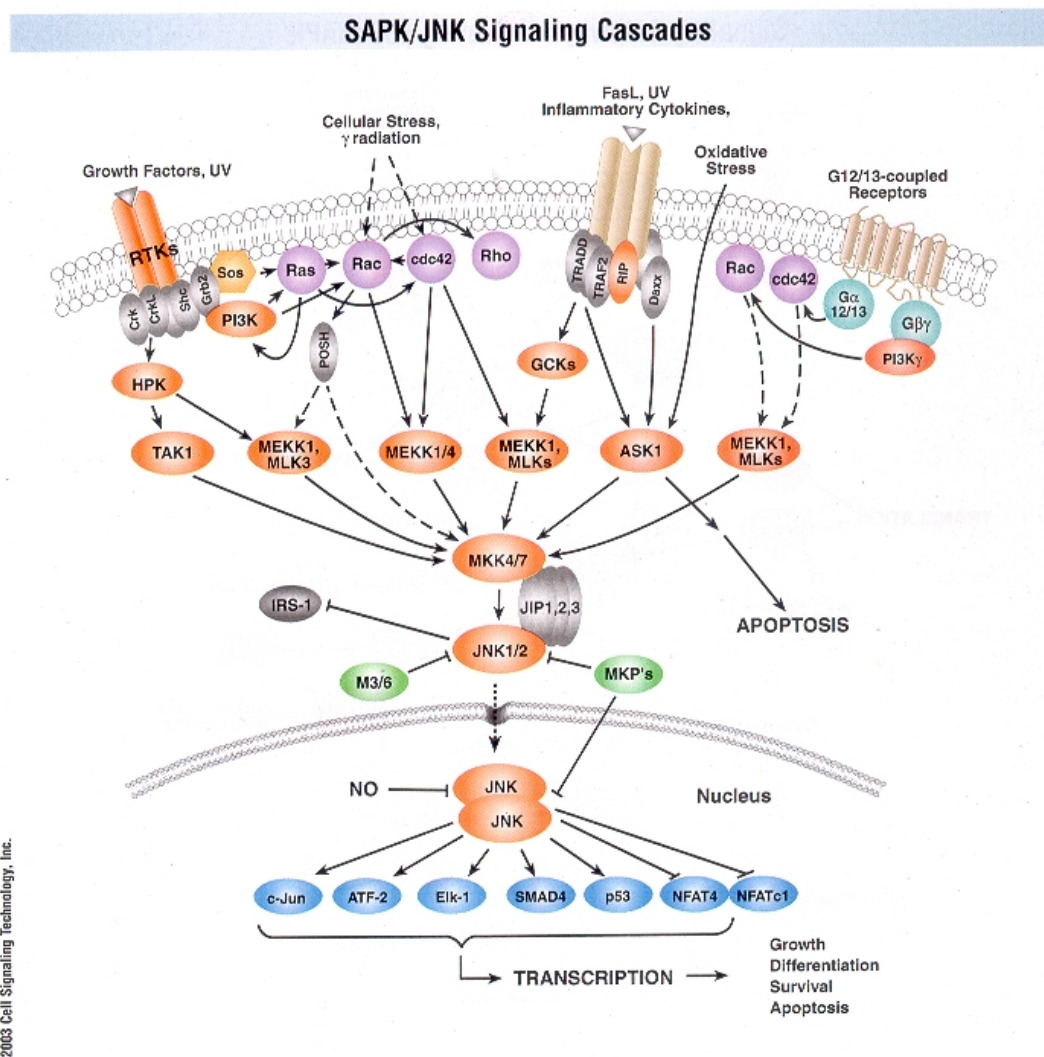
SAPK = stress activated protein kinase

JNK = c-jun N-terminal kinase

SAPK/JNK werden durch UV-Strahlung, chemisch, oxidativ, hypoxisch, unter Sauerstoffabschluß, Hitzeschock und Entzündungszytokine aktiviert. SAPK/JNK führen zu Proliferation, Differenzierung und Apoptose und scheinen für Hämatopoese, T-Zellproliferation, Leberregeneration und metabolisch gestresste Leber wichtig zu sein.

Aktiviert werden diese Kinasen durch G-Proteine, Rac und Cdc42, welches MEKK aktiviert. MEKK1 ist diejenige Kinase, welche die SAPK/JNK-Kaskade anstößt. MEKK4 phosphoryliert SAPK/JNK in Thr-Pro-Tyr und aktiviert so die Transkriptionsfaktoren c-Jun, Elk-1, und AFT-2 (Hipskind, 1998).

Außer G-Protein kommen noch Ras und Tyrosinkinasen als Aktivatoren der JNK-Kaskade dazu (Jo, 1997).



**Abb. 2.5:** SAPK und JNK sind Mitglieder der MAP-Kinasenfamilie und werden durch Umgebungsstress, Entzündungszytokine, Wachstumsfaktoren und GPCR-Agonisten aktiviert. Wie bei anderen MAP-Kinasen ist die membrannahestehende Kinase eine MAPKKK, typischerweise MEK1-4, oder eine MLK, welche MKK4 oder 7 aktiviert und phosphoryliert. SAPK/JNK translozieren zum Zellkern, von wo aus sie die Aktivität mehrerer Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, ATF-2 und p53 regulieren.

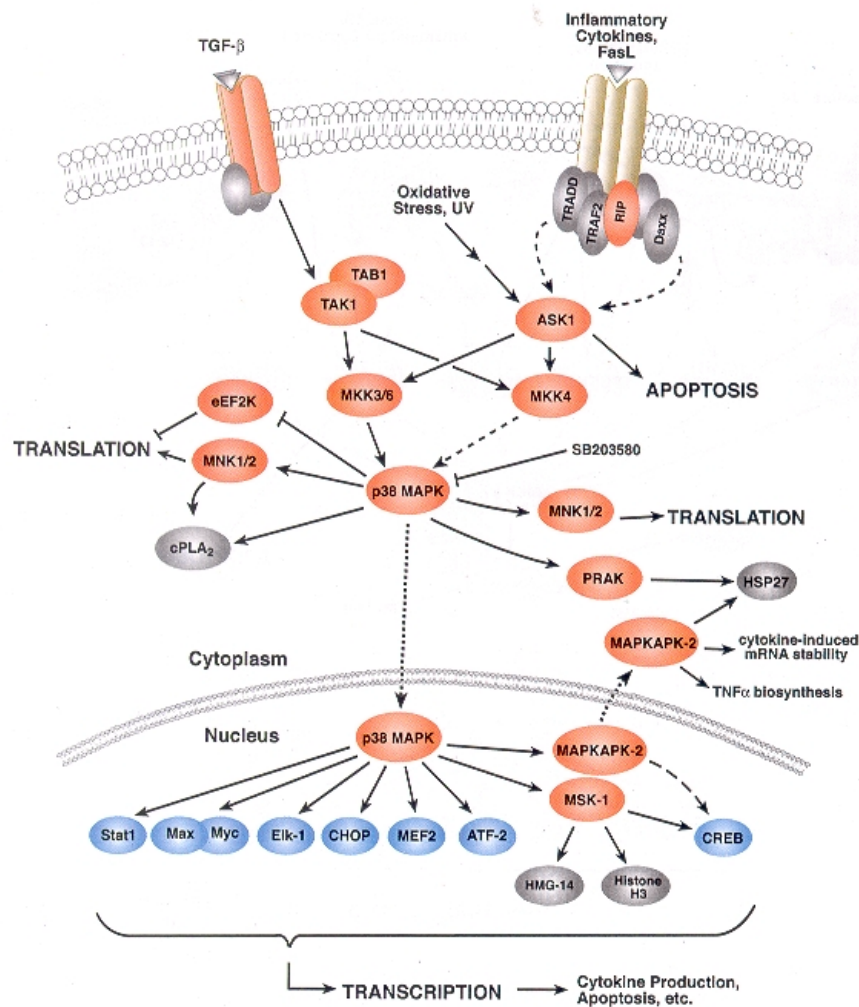
### 2.7.1.3 p38MAP-Kinase–Signalkaskade

Die p38MAP-Kinase (stress activated protein kinase) wird durch Entzündungszytokine, hohe Osmolarität und Bakterienpolysaccharide über MKK3, 4 und 6 aktiviert. MKK3, 4 und 6 haben TAK1 (Transforming Growth Faktor beta Activated Kinase), ASK1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase) und MTK1 (Three Kinase 1 for Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase) als mögliche Aktivatoren. pMKK4 scheint eine unnormale vorrübergehende Transfektion zu sein, da es nicht jedes Mal zu einer Aktivierung kommt. Substrate der p38MAPK sind die Transkriptionsfaktoren TCFs, Elk-1, SAP-1a, ATF-2 und CHOP. p38MAP-Kinase kann eine oder mehrere MAP-Kinase-Kaskaden selektiv aktivieren, was für die Proliferation von Osteostammzellen wichtig ist (Hipskind, 1998). IL-1 $\alpha$  induziert über ERK1/2 und p38MAPK die Synthese von IL-6 in Osteoblasten (Miwa, 1999).

### 2.7.1.4 Paradoxe Aktivierung

p38MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 führt in menschlichen HL60 Leukämiezellen durch Hemmung von p38MAPK zur gesteigerten Phosphorylierung von p38MAP und zur Aktivierung von JNK und ERK. Es wird angenommen, daß durch Hemmung der p38MAPK-Aktivität kompensatorisch ein *upstream*-Regulator stressaktivierter Kaskaden aktiviert wird. MLK3 (mixed lineage kinase) hat Eigenschaften, die denen eines solchen Regulators nahe kommen. MLK3 aktiviert JNK, p38MAPK sowie ERK und stellt so eine Verbindung zwischen diesen Kaskaden her. Möglicherweise ist MLK3 *downstream* von MEKK1-3, welche andere Substrate für einen Regulator sind, der die ERK-, JNK- und p38MAPK-Kaskade miteinander verbindet. Hemmung der p38MAPK durch SB202190 bewirkt eine deutlich gesteigerte Aktivierung der p38MAPK und JNK1. JNK2, MEK und ERK zeigen dagegen eher schwache Aktivitätssteigerung. Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich darauf, daß p38MAPK und JNK1 durch den *upstream*-Regulator direkt kontrolliert werden, während der Einfluß des Regulators auf JNK2, MEK und ERK eher schwach ist (Wang, 2000).

### Signaling Pathways Activating p38 MAPK



© 2003 Cell Signaling Technology, Inc.

**Abb. 2.6:** p38MAP-Kinasen werden durch Umgebungsstress und Entzündungszytokine aktiviert. Die membrannahestehende Kinase ist eine MAPKKK, typischerweise eine MKK oder MLK (mixed lineage kinase). MAPKKK phosphoryliert und aktiviert MKK3/6, welche die p38MAP-Kinase aktiviert. p38MAP-Kinase ist an der Regulierung von Hsp27, MAPKAPK-2 und mehreren Transkriptionsfaktoren u.a. ATF-2, Stat1, MEF-2 und Elk-1 beteiligt.

### 2.7.2 JAK/STAT-Weg

Zahlreiche Zytokine, einschließlich Interferone (IFN), Interleukine (IL) und Wachstumsfaktoren induzieren durch STATs (signal transducers and activators of transcription) die Transkription *early response genes* (Finbloom, 1995).

Interleukin-6-Typ-Zytokine (IL-6, IL-11, Oncostatin M, etc.) binden an Rezeptoren, die Kinasen der JAK-Familie (Janus Kinasen) aktivieren und induzieren die Tyrosinphosphorylierung und Zellkerntranslokation der STATs. Neben dem JAK/STAT-Weg sind auch ERKs an der Signaltransduktion der IL-6-Typ-Zytokine beteiligt, da durch sie STATs eine maximale Transkriptionsaktivität erlangen. Untersuchungen ergaben, daß IL-6-Typ-Zytokine sowohl JAK/STAT als auch MAP-Kinasen in osteoblastischen Zellen aktivieren. IL-6-Typ-Zytokine stimulieren in MG-63 Zellen die alkalische Phosphatase und Osteokalzinexpression und hemmen die Zellproliferation (Bellido, 1997).

Durch Bindung von Zytokinen (IL, IFN) und Wachstumsfaktoren (EGF) werden JAKs aktiviert, die vermutlich STATs in ihren Tyrosinresten phosphorylieren. Aktivierte STATs wandern in den Zellkern und binden dort an spezifische DNA-Sequenzen und stimulieren die Transkription. Der Beweis, dass Jaks mit IFN-Rezeptoren verbunden sind, ist indirekt, aber Übereinstimmungen von Phosphorylierungen und genetischen Daten lassen darauf schließen, dass Jak1/2 mit IFN- $\gamma$ -, Jak1 und Tyk2 mit IFN- $\alpha$ -Rezeptoren verbunden sind (Darnell, 1994).

Die Janus-Familie der Tyrosinkinasen (Jak1-3, Tyk2) ist wesentlicher Bestandteil vieler Zytokin aktivierter Signalkaskaden und an Zytokinrezeptoren gebunden. Die JAKs, Jak1 und Tyk2 binden zusammen mit der SH2-Domäne an ein GST-Fusionsprotein, das aus 50 membranproximalen Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheit des IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptors besteht, aber auch ERK2 ist an dieser Region zu finden (David, 1995).



### 2.7.3 Integrine

Integrine sind Glykoproteine, die als Heterodimer aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit bestehen (s. auch 2.5 Mechanotransduktion, *Biochemische Kopplung*).

Eine der ersten Wirkungen von mechanischem Stress auf Integrine ist, dass das Zytoskelett zu einem „Anker“ verwandelt wird. Dabei variiert die Bindungsstärke des „Ankers“ in Abhängigkeit vom Ausmaß mechanischer Kraft.

In U2OS Osteosarkomzellen können durch mechanisch stimulierte Integrine intrazelluläres Calcium ansteigen, Tyrosinkinasen phosphorylieren und über die MAP-Kinase-Kaskade auf die Zellproliferation und Genexpression wirken. Die Menge an Tyrosinkinasenphosphorylierung hängt davon ab, welche Art von Rezeptoren stimuliert und in welcher Art und Weise physikalische Kräfte appliziert werden. Durch Stress von 1 Hz wird mehr Phosphorylierung von Tyrosinkinasen erbracht, als wenn dieser dauerhaft ist. Im Rahmen der mechanischen Stimulierung reguliert Calcium die Bindung zwischen aktivierten tyrosinphosphorylierten Proteinen und dem Zytoskelett (Schmidt, 1998).

### 2.7.4 MAP-Kinase-Kaskade in Osteoblasten

PDGF-BB, EGF, basic FGF, Phorbol ester, Östrogen und Fluorid in mitogener Dosis aktivieren die ERK-Kaskade in Osteoblasten, in osteoblast-ähnlichen Zelllinien und in osteoblastischen Zellen des Menschen und der Ratte. Dabei zeigte sich auch in anderen Zelltypen eine enge Verbindung zwischen der ERK und c-fos-Aktivierung.

In UMR106 Osteosarkomzellen kann PTH über eine PKA-abhängige Kaskade der ERK-Aktivierung entgegenwirken.

AP-1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der MAP-Kinase-Kaskade, da es in der Kontrolle zahlreicher osteoblastenspezifischen Gene, z.B. des Kollagen Typ 1, Osteopontin, Osteonektin und Osteokalzin mit einbezogen

ist. Als Antwort auf TPA vermittelt AP-1 die Genexpression und bindet TRE (TPA-response elements) des c-jun Promotors. AP-1 liegt oft vor als Heterodimer aus c-Jun und c-Fos oder aus einem sonstigen Jun- und Fos-Protein (Hipskind, 1998).

## **2.8 Klinische Relevanz**

Das Leben von Zellen wird in nahezu allen Bereichen durch reversible Phosphorylierung von Proteinen kontrolliert, während eine abnormale Proteinphosphorylierung zu einer Reihe von Krankheiten führt. Daher besteht ein zunehmendes Interesse an der Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Proteinkinasen mit therapeutischer Wirkung.

Eine „unpassende“ Aktivierung der Ras/MAPK-Kaskade ist Ursache für Tumoren, weshalb im Falle der geschilderten paradoxen Wirkung der Inhibitoren SB203580 und ZM336372 (s. 2.6.5) diese keine geeigneten Medikamente gegen Tumoren sind, da sie c-Raf aufgrund der negativen Feedback-Schleife aktivieren (Hall-Jackson, 1999).

## **2.9 Zielsetzung der Arbeit**

Die Zellantwort von Osteoblasten und hier im Besonderen der humanen Osteosarkomzelllinie MG-63 auf physiologische mechanische Dehnung ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Zwar weiß man, dass Zellen auf mechanische Dehnung mit Steigerung der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung vieler Substrate reagieren, aber über die einzelnen Signalwege ist bis heute noch nicht alles im Detail aufgeklärt.

Um mehr über die Signaltransduktionswege von Knochenzellen zu erfahren, werden im Labor für experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg Osteoblasten und Osteosarkomzellen unter

dem Einfluß von in Signalkaskaden eingreifenden Inhibitoren mechanisch gedehnt. Für die mechanische Dehnung wurde in unserem Labor die *4-point-bending-maschine* entwickelt, die es möglich macht, Zellen physiologisch, uniaxial und nach einstellbaren Frequenzen und Stärke von strain homogen zu dehnen.

Inhalt dieser Arbeit ist, das Aktivierungsverhalten von ERK1/2 humaner Osteosarkomzellen der Zelllinie MG-63 im Rahmen der mechanischen Dehnung unter dem Einfluß von Inhibitoren näher zu untersuchen. MG-63 Zellen wurden dazu mechanisch gedehnt und anschließend unterschiedlich lange inkubiert, um die Zeit mit maximaler ERK1/2-Aktivierung zu bestimmen. Zusätzlich wurden vor der Dehnung die Zellen mit Inhibitoren und Aktivatoren behandelt, deren Einfluß hinsichtlich der ERK1/2-Aktivierung ohne und mit Dehnung untersucht werden sollte.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung	gebrauchsfertige 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid
(APS) Ammoniumpersulfat	Fluka
Ascorbinsäure	WAKO
BCIP	Sigma
BSA (Albumin bovine Fraction V, standard grade, lyophil, pH 7	Serva
Calyculin A	Calbiochem
Complete-Mini-Proteasen-Inhibitoren- Cocktail	Roche
Coomassie-Brilliant Blue G-250	Roth
FCS (fetales Kälberserum)	PAA, A15-043
L-Glutamin	PAA
Molekulargewichtsstandard (SDS- PAGE, high range, molecular weight standards)	Bio Rad
MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- Diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma
NBT	Sigma
Penicillin	PAA
Streptomycin	PAA
TEMED	Serva
Tris	Bio Rad
Triton X-100	Merck
Trypsin-EDTA	Sigma
Tween 20	Serva

### 3.2 Lösungen und Puffer

AP-Färbelösung	NBT-Stammlösung BCIP-Stammlösung AP-Puffer	66µl 33µl 10ml
AP-Puffer	NaCl MgCl <sub>2</sub> Tris	100mM 5mM 100mM
BCIP-Stammlösung 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat 100% Dimethylformamid	0,5g in 10ml
Blockierungslösung	BSA TBS Tween 20	5% bzw. 0,01% mit Prim.-AK  0,1% in TBS
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure Methanol	1% 50% in ddH <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliantblau R-250 Essigsäure Methanol	0,2%  2% 40% in ddH <sub>2</sub> O
Laufpuffer	Tris Glycin SDS	25mM 192mM 0,1% in ddH <sub>2</sub> O
Lysepuffer	Imidazole-HCl pH 6,8 KCl MgCl <sub>2</sub> EGTA NaF	20mM 100mM 1mM 10mM 10mM

	Na-Vandate Na-Molybdate Calyculin A Triton X-100 Complete-Mini Proteasen-Inhibitoren- Cocktail	1mM 1mM 1µM 1% 1 Tablette für 10ml Lyselsg.
MTT-Stammlösung	MTT, PBS	5mg MTT/ml PBS
NBT-Stammlösung	NBT 70% Dimethylformamid	0,5g 10ml
PBS	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH	136mM 2,6mM 8mM 1,1mM 7,4
Sammelgelpuffer	Tris SDS pH	125mM 1,2% 6,8, in ddH <sub>2</sub> O
SDS-Probenpuffer	Tris-HCl SDS Glycerin EDTA Bromphenolblau pH	125mM 2% 10% 1mM 0,01% 6,8
TBS	NaCl KCl Tris pH	8g 0,2g 2g 7,4, in ddH <sub>2</sub> O
Transferpuffer	Tris Glycin	48mM 39mM

	SDS	0,0375%
	Methanol	20% (v/v)
Trenngelpuffer	Tris-HCl	375mM
	SDS	0,1%
	pH	8,8

### 3.3 Zelllinien

Osteosarkomzellen MG-63	Mensch	ATCC
----------------------------	--------	------

### 3.4 Nährmedium

RPML-1640 (1x)	PAA
----------------	-----

Im Zellkulturmedium waren enthalten 10% FCS (außer siehe Versuchsbeschreibung), 10µg/ml Vit C-Phosphat, 2mM L-Glutamin und je 50E/ml Penicillin/Streptomycin

### 3.5 Aktivatoren

TPA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Calbiochem
-------------------------------------	------------

### 3.6 Inhibitoren

BAPTA, AM cell permeant	Mo Bi Tec (Molecular Probes), B-1205
Gö 6976 12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indol[2,3-a]pyrrol[3,4-c]-carbazol	Calbiochem, Kat.-Nr.365250

Gö 6983 2-(1H-indol-3-yl)-3-[1-(3-dimethylaminpropyl)-1H-indol-3-yl]maleinimid	Calbiochem, Kat.-Nr. 365251
---	-----------------------------

### 3.7 Antikörper

Monoclonal Anti-MAP Kinase, activated (Diphosphorylated ERK-1&2)	Sigma, M-8159
Mouse Immunoglobulins/AP	Dako, D 0314

### 3.8 Geräte

Casy1 Cell Counter	Schärfe System
Elektrophorese	Bio Rad
Power-Supply	Bio Rad
“4-Punkt-Dehnungsmaschine“	Eigenentwicklung von David Jones
Western-Blot-Apparatur	Biometra

Die zur üblichen Standardlaborausrüstung zählenden Geräte und Materialien werden an dieser Stelle nicht aufgelistet.

### 3.9 sonstige Materialien

Aquarium-Silikonkleber	Dow-Corning
PVDF-Membran (Porengröße 0,2 µm)	Bio Rad
Silikonstücke	med. Qualitätsgrad 55Shore A



## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Humane MG-63 Osteosarkomzellen

Humane Osteosarkomzellen der Zelllinie MG-63 wurden von der Firma ATCC bestellt, die zahlreiche andere Tumorzellen für den Verkauf anbietet.

#### 4.1.2 Splitten der Zellen

Zunächst wurden die Zellen ca. alle 2 Tage vor dem Mediumwechsel unter dem Mikroskop betrachtet und bei Erreichen von Semikonfluenz gesplittet, da Tumorzellen in der Kultur nicht zu dicht wachsen sollen. Das Zellmedium wurde abgesaugt und anschließend 2mal mit je 5ml PBS gespült. PBS wurde abgesaugt und Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben, 2ml Trypsin bei kleinen Kulturflaschen und 3-5 ml bei größeren. PBS und Trypsin wurden dazu vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Für ca. 2min wurden die Zellen mit Trypsin im Brutschrank inkubiert, damit sich die Zellen von der Unterfläche ablösen. Um anschließend die Reaktion mit Trypsin zu stoppen, wurde die 3-fache Menge an Medium dazugegeben. Das Gemisch wurde dann in ein Falcon-Tube pipettiert und 10min lang bei 800-1000 Umdrehungen/min zentrifugiert, die Flüssigkeit danach abgesaugt, zum Zellpellet Medium dazugegeben und schließlich hin und her pipettiert, damit sich das Pellet wieder in die Zellen auflöst. Die Zellen wurden dann entweder in neue Zellkulturflaschen zum Wachsen gegeben oder im Cell-Counter Casy1 gezählt, um sie dann in flüssigem Stickstoff einzufrieren oder auf die Dehnungsplatten für die Versuche zu passagieren.

Material: RPMI-1640-Medium  
Trypsin 10% in PBS

#### 4.1.3 Einfrieren von Zellen

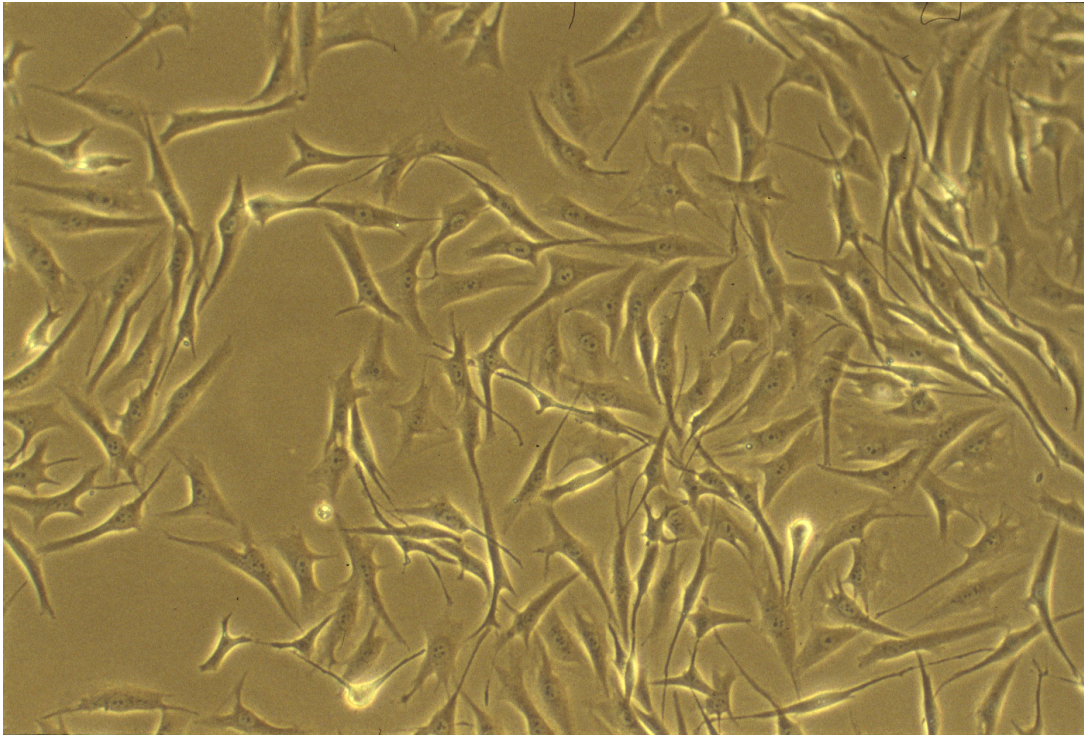
Dadurch, dass die Zellen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden, können sie jahrelang aufbewahrt werden. Nach Messung der Zellzahl wurden jeweils 900  $\mu\text{l}$  des Zellgemischs und je 900  $\mu\text{l}$  eisgekühltes 20%iges DMSO in RPMI-1640-Medium in Kryoröhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen drei mal hin und her geschwenkt, um die Zellen mit DMSO zu mischen und sofort auf Eis gelegt. Die Kryoröhrchen wurden dann in einen mit Iso-Propanol gefüllten Plastikbehälter gegeben und sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

Material: RPMI-1640-Medium  
DMSO  
Isopropanol

#### 4.1.4 Passagieren von Zellen auf Dehnungsplatten

Je nachdem, ob gerade genügend Zellen in der Kultur waren, wurden diese für die Dehnungsversuche verwendet oder welche aufgetaut.

Die in den Kryoröhrchen eingefrorenen MG-63 Zellen wurden im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad 2-3min lang aufgetaut. Das Zellgemisch wurde in ein Falcon-Tube mit 10ml vorgewärmten RPMI-1640-Medium gegeben, 10min bei 800-1000 Umdrehungen/min zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet im vorgewärmten RPMI-1640-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in die Zellkulturflaschen mit frischem RPMI-1640-Medium gegeben. Nachdem ausreichend Zellen in der Kultur gewachsen sind, wurden sie auf die Dehnungsplatten passagiert und die restlichen für die nachfolgenden Versuche weiter kultiviert. Um eine Dichte von 60 000 Zellen/ $\text{cm}^2$  zu erhalten, wurden pro Dehnungsplatte 500 000 Zellen mit je 5ml RPMI-1640-Medium ausgesät und im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 1 Tag zeigte sich ein semikonfluentes Wachstum, so daß mit den Versuchen begonnen werden konnte.



**Abb. 4.1:** Zellkultur von MG-63 Osteosarkomzellen der 10. Zellpassage.

## **4.2 Dehnungsexperimente**

### **4.2.1 Grundlagen**

Die auf den Dehnungsplatten passagierten MG-63 Zellen wurden auf ihr semikonfluentes Wachstum hin überprüft, was sich meist 1 Tag nach dem Aussäen der Zellen auf die Platten zeigte. Um die Dehnungsversuche durchführen zu können, erfolgte 18h vorher ein Mediumwechsel mit serumfreiem RPMI-1640-Medium, um den Einfluß von FCS auf die Aktivierung der Ras-Raf-Kaskade zu verhindern, da die enthaltenden Wachstumsfaktoren des FCS zu einer ERK1/2-Aktivierung führen. Mit 4000 $\mu$ strain, 30 Zyklen und 1 Hz bei 37°C wurden die Zellen auf den Dehnungsplatten mit der von Prof. Dr. Jones eigens entwickelten „4-Punkt-Dehnungsmaschine“ gedehnt (Jones, 1993). Um zu überprüfen, ob MG-63

Zellen durch Dehnung mit 4000 $\mu$ strain, 30 Zyklen und 1 Hz stimuliert werden, wurde der MTT-Proliferationsassay durchgeführt.

Je nach Versuch wurden die Zellen ohne anschließende Dehnung oder vor der Dehnung mit TPA und unterschiedlichen Inhibitoren behandelt. Die ERK1/2-Aktivierung wurde dann mit der Positiv- (nur Dehnung) und Negativ-Kontrolle (keine Dehnung) verglichen. Mit der gleichen Zellpassage wurden die Dehnungsversuche jeweils ein- bis zweimal durchgeführt.

#### **4.2.2 Polykarbonatplatten**

Polykarbonat ist ein Kunststoff, der hart, thermostabil und transparent ist und eine hohe elastische Deformierbarkeit aufweist. In den Dehnungsversuchen wurden Polykarbonatplatten mit einer Länge von 12,9cm, 5cm Breite und 2,93mm Dicke verwendet. Auf die Mitte der Plattenoberfläche wurden jeweils 4 Silikonstreifen mit Silikonkleber geklebt, so daß diese eine Fläche von 20cm<sup>2</sup> begrenzen, worauf später die Zellen für die Dehnungsversuche ausgesät wurden. 24h nach dem Lufttrocknen wurden die Platten für 1 Tag in ddH<sub>2</sub>O gelegt und anschließend bei 65°C in der Spülmaschine gespült. 30minütiges Einlegen in 70% vergälltem Ethanol und Trocknen unter der Sterilwerkbank bewirkte Keimfreiheit. Um den Restalkohol auf der eingeklebten Plattenfläche zu entfernen wurde zweimal mit PBS gespült. Auf die Silikonstreifen wurden Glasdeckel gegeben, so daß mit den Zellen unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden konnte. Die Glasdeckel wurden ebenfalls 30min in 70% vergällten Alkohol gelegt und wie die Platten luftgetrocknet.

Durch die Dehnung werden die Platten in ihren oberen Schichten gedehnt und die unteren komprimiert, während die mittleren Fasern in ihrer Länge unverändert bleiben, da sie sich in der „neutralen Zone“ befinden.

Material: Polykarbonatplatten (12,9x5x0,293cm)  
Silikonmatten (55 Shore A)  
Aquarien-Silikonkleber

### 4.2.3 Dehnungsapparatur

Die „4-Punkt-Dehnungsmaschine“ ist eine Konstruktion von David Jones zur Dehnung von Zellen (Jones, 1987), die es möglich macht, definierte Belastungen auf alle Zellen gleichförmig auszuüben.

Die Dehnungsplatte wird in das Gerät so eingelegt, dass sie den Stützpunkten aufliegt und durch zwei andere weiter auseinander liegende Dehnungspunkte an der Plattenoberfläche nach unten gedehnt wird. Die Stützpunkte sind verstellbar und haben einen geringeren Abstand zueinander als die Dehnungspunkte.

Die Dehnung (*strain*) ist abhängig von folgenden Gegebenheiten:

- Abstand der beiden Stützpunkte
- Plattendicke
- Höhe der Auslenkung

Strain ist definiert als eine Änderung der Länge pro Längeneinheit und ist dimensionslos. 1 Strain (str) bedeutet eine Längenänderung von 100%. 4000 $\mu$ str entsprechen einer physiologischen uniaxialen Dehnung eines Knochens um 0,4%.

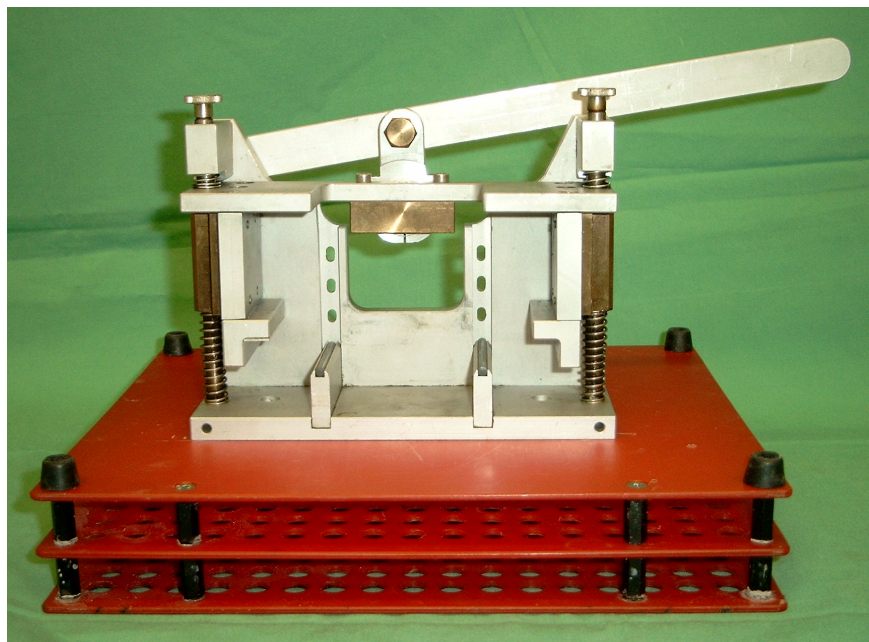
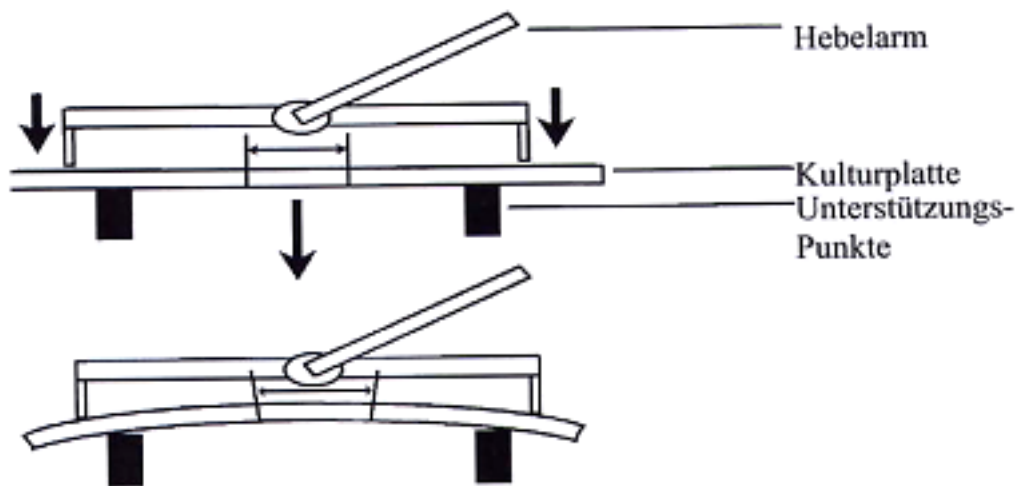
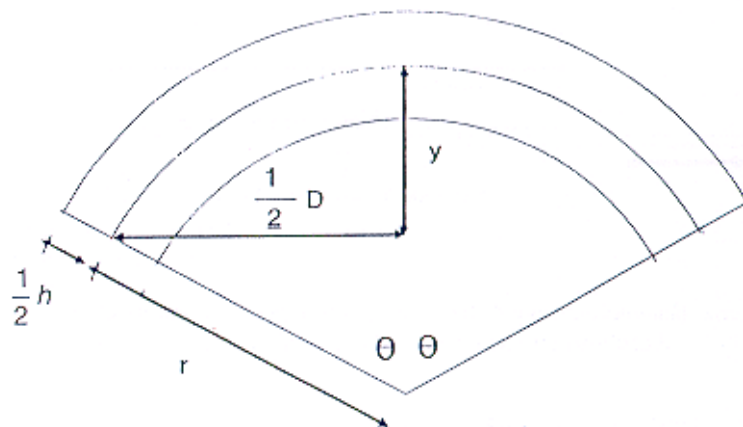


Abb. 4.2: Dehnungsapparatur nach Jones



**Abb. 4.3:** Funktionsweise der 4-Punkt-Dehnungsmaschine.



**Abb. 4.4:** Geometrische Beschreibung der Biegung einer Platte zwischen 2 Stützpunkten, die eine kreisförmige Verformung zur Folge hat.

$h$  = Plattenstärke  
 $D$  = Abstand zwischen den Stützpunkten  
 $y$  = Auslenkung  
 $S$  = Strain  
 $r$  = Radius

$$S = \frac{4hy}{D^2 + 4y^2}$$

### **Problematik**

Die Versuche in dieser Arbeit konnten leider nur noch durch Handbedienung der „4-Punkt-Dehnungsmaschine“, ebenfalls eine Eigenkonstruktion von Jones, durchgeführt werden, indem der Hebel als Auslenker nach unten gedrückt wurde. Es wurden jeweils 30 Belastungszyklen mit einer Dauer von 1 sec, was einer Frequenz von 1 Hz entspricht, durchgeführt. Wegen außergewöhnlich penibler Einübung und Bemühungen, die manuelle Dehnung in möglichst identischer Art und Weise wie die maschinelle durchzuführen, kann schwerlich in Erwägung gezogen werden, dass dies auf die ERK1/2-Aktivierung einen systematischen Einfluß haben könnte.

#### **4.2.4 MTT-Zellproliferationsassay**

Tetrazolin-Salz (3-[4,5-Dimethyldiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) ist eine blaßgelbe Substanz, die von lebenden, stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und im Mitochondrium dieser Zellen durch Spaltung des Tetrazolinringes mittels der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase in ein dunkelblaues wasserunlösliches Formazanprodukt gespalten wird. Organische Lösungsmittel können diese Kristalle lösen, wodurch die Zellproliferation, Vitalität und Zytotoxizität durch photometrische Bestimmung bei 580nm bestimmt werden kann, da ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen Zellzahl, Stoffwechselaktivität und der Absorption in einer homogenen Zellpopulation besteht. Stoffwechselaktive Zellen produzieren mehr Formazan als weniger aktive Zellen. Selbst bei einer Konzentration von  $10^6$  absorbieren die Zellen im Medium nicht signifikant (Mosmann, 1983).

Um die Stoffwechselaktivität und damit die Proliferation von MG-63 Zellen zu bestimmen, wurden diese mit einer Dichte von 60 000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und mit 9-Well-Dehnungsplatten gedehnt (0,5cm<sup>2</sup>/Well). Als Negativ-Kontrolle wurden ungedehnte Zellen verwendet.

- 1. Tag:** Aussäen der Zellen auf 9-Well-Dehnungsplatten.
- 2. Tag:** Überprüfen der Zellen auf semikonfluentes Wachstum, dann Dehnung der Zellen mit 4000 $\mu$ str, 30 Zyklen und 1 Hz. Anschließend wurden die Zellen mit neuem Medium versehen.
- 3. Tag:** erneute Dehnung nach 24h.
- 4. Tag:** Das Nährmedium wurde abgesaugt und 100 $\mu$ l MTT-Lösung (Lsg. 2) pro Well pipettiert. Nach 4h Inkubation bei 37°C wurde die MTT-Lösung gegen 100 $\mu$ l Lösungsmittel (Lsg. 3) ausgetauscht und für 15min bei RT inkubiert. Leerwerte, Kontrollen und Proben wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und deren Extinktion bei 580nm gemessen. Für die Auswertung wurde der Mann-Whitney „U-Test“ verwendet.

Material: MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)  
Lsg. 1: MTT-Stammlsg. 5mg MTT/ml PBS  
Lsg. 2: MTT-Lsg. 1:10 Verdünnung aus Lsg. 1  
in RPMI-1640-Medium ohne Zusätze.  
Lsg. 3: Lösungsmittel 20% SDS, 50% Dimethylformamid  
in ddH<sub>2</sub>O, pH 4,7 einstellen und filtrieren.

## 4.3 Gelelektrophorese und Immunoblot

### 4.3.1 Lysieren von Zellen

Je nach Versuchsdurchführung wurden die Zellen nach der Dehnung unterschiedlich lang oder 2min bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde anschließend sofort abgekippt, die Platten auf Eis gelegt und die Zellen vorsichtig mit 4°C kaltem PBS gespült, um die weitere Wirkung von Aktivatoren, Inhibitoren und Dehnung auf die ERK1/2-Aktivierung zu stoppen. PBS wurde abgekippt und 1ml 4°C PBS dazugegeben. Mit Zellschabern wurden die Zellen vorsichtig von der Plattenoberfläche gelöst, in auf Eis vorgekühlte Eppendorf-Mikrolitergefäße pipettiert und 10min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet



mit 30-40µl Lyse-Lösung lysiert. Das Gemisch wurde mit dem Vortex-Mixer gemischt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder gevortext, bevor anschließend dann 10min bei 13 000 U/min zentrifugiert wurde. Der Überstand, der die Proteine beinhaltet, wurde für die Versuche gelagert.

Material: PBS  
Zellschaber  
Lyselösung

20mM Imidazole-HCL, pH 6,8
100mM KCl
1mM MgCl <sub>2</sub>
10mM EGTA
10mM NaF
1mM Na-Vandate
1mM Na-Molybdate
1µM Calyculin A
1% Triton X-100
1Tablette Complete-Mini Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (1Tablette für 10ml Lyse-Lösung) in ddH <sub>2</sub> O ansetzen

## 4.3.2 Bradford-Assay

### 4.3.2.1 Grundlagen

Zur quantitativen Proteinbestimmung kam der colorimetrische Nachweis nach Bradford zur Anwendung. Der Bradford-Assay ist eine einfach durchzuführende, sensitive und wenig störanfällige Standardmethode (Bradford, 1976), dessen Nachweis auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G an Proteine beruht. Der Farbstoff bindet über Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen bevorzugt an Argininreste sowie in geringerem Maße an einige andere basische und aromatische Aminosäurereste (Compton, 1985). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt unter optimalen Bedingungen im 1ml-Assay unter 1µg Protein (Read, 1981). Der Farbstoff liegt in saurer Lösung hauptsächlich in der kationischen Form vor mit einem Absorptionsmaximum von 470nm. Bei der Bildung des Farbstoff-Proteinkomplexes wird dagegen die im Gleichgewicht mit der kationischen

Form stehende anionische Form des Farbstoffes stabilisiert, welche ein Absorptionsmaximum von 595nm besitzt (Compton, 1985). Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Proteinkomplexes außerdem sehr viel höher als der des freien Farbstoffes ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595nm durch Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagens photometrisch gemessen werden (Eckert, 1996).

#### 4.3.2.2 Versuchsdurchführung

Aus dem angesetzten Proteinstandard (10% BSA) wurden **a** 5µl und **b** 10µl entnommen und mit ddH<sub>2</sub>O **a** 1:100 auf 500µl und **b** 1:10 auf 100µl verdünnt.

Aus der 1:100 Verdünnung **a** wurde in je 2 parallele Eppendorf-Mikrolitergefäße pipettiert: 10µl (=1µg Protein), 20µl (=2µg), 40µl (=40µg), 70µl (=70µg) und 100µl (=100µg).

Aus der 1:10 Verdünnung **b** wurde entsprechend je 2mal pipettiert: 15µl (= 15µg Protein) und 20µl (=20µg).

Alle Proben wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt und 2 Leerproben mit je 100µl ddH<sub>2</sub>O pipettiert. Parallel dazu wurden aus den Proben der Dehnungsversuche je 1µl, 3µl und 5µl entnommen und diese ebenfalls mit ddH<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt. Zu allen Proben wurden 900µl Coomassie-Farbreagens pipettiert und gemischt. Nach 20min wurde die Extinktion im Photometer bei 595nm gemessen.

Material: BSA (Bovine Serum Albumine), 10% BSA in ddH<sub>2</sub>O  
Albumin bovine Fraction V, standard grade  
Coomassie Brilliantblau G 250  
Lysatproben  
Photometer

Mit Hilfe eines von Jürgen Leitsch selbst erstellten Programms konnten die Konzentrationen der Proteinproben durch eine Eichgerade der Extinktionsmittelwerte des Proteinstandards berechnet werden. Um die Lysatproben verwerten zu können sollten diese möglichst auf einer Geraden liegen.

### 4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 4.3.3.1 Grundlagen

Proteine besitzen einen unterschiedlichen Anteil an positiv und negativ geladenen sowie ionisierbaren Aminosäureresten. Die elektrophoretische Mobilität in einer porösen Gelmatrix ist daher nicht nur von der Größe und Form, sondern auch von der Nettoladung unter den jeweiligen Bedingungen abhängig. Eine Auftrennung von Proteinen ausschließlich nach Größe ist nach Behandlung mit SDS (Natriumdodecylsulfat) zusammen mit Schwefelbrücken-spaltenden Thiolreagenzien möglich. Die Proteine werden dadurch denaturiert und durch hydrophobe Wechselwirkung kommt es zu einer gleichmäßigen Beladung der Polypeptidketten mit dem negativ geladenen SDS, wobei die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden. Es entstehen SDS-Protein-Mizellen, die hydrodynamisch äquivalente Konformationen und gleiche Ladungsdichte pro Längeneinheit haben, d.h. es besteht ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis. Der Molekularsiebeffekt macht es möglich, Proteine nach deren relativen Molekülgröße elektrophoretisch aufzutrennen. Als Trennmedium wird meist Polyacrylamid verwendet, das durch Co-Polymerisation von Acrylamid mit einem Vernetzer, meist N,N'-Methylenbisacrylamid („Bis“) hergestellt wird. Zwischen Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) kommt es zu Wechselwirkungen und mit ihnen zur Entstehung freier Radikale, welche die Vinyladditions-Polymerisationsreaktion auslösen. Es bilden sich Polymerketten und dadurch Bisacrylamid-Quervernetzungen. Die „effektive“ Porengröße korreliert mit dem Ausmaß der Hohlräume zwischen den vernetzten Polymerketten, sie ist umgekehrt proportional zur Gesamtkonzentration der Monomere und abhängig vom Vernetzungsgrad. Die Proteinauftrennung erfolgte mit der eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D SDS-PAGE) nach dem diskontinuierlichen System nach Laemmli. Diskontinuität bezieht sich auf die Gelstruktur, indem ein großporiges Sammelgel einem engporigen Trenngel aufgelagert

ist, den pH-Wert und die Art und Konzentration der Ionen in den Puffern. Aufgrund der Diskontinuität des pH-Wertes wandern nach Anlegen einer Spannung Cl-Ionen als „Wanderionen“ den Glycinmolekülen voraus und dazwischen konzentrieren sich die SDS-Proteinkomplexe. Das Trenngel mit dem höheren pH-Wert bewirkt jetzt eine negative Ladung des Glycins, das nun die Proteine überholen kann. Schließlich werden durch unterschiedlich starke Wechselwirkung mit der Gelmatrix die Proteine nach dem Molekularsiebeffekt aufgetrennt.

Üblicherweise werden SDS-denaturierte Proteine mit 5-15%igen Trenngelen aufgetrennt. Innerhalb eines begrenzten Bereichs besteht eine lineare Beziehung zwischen dem  $\log_{10}$  des Molekulargewichts ( $D$ =Dalton) und der relativen Mobilität (Wanderstrecke des Proteins/Wanderstrecke der Lauffront). Dieser lineare Bereich liegt bei 10%igen Gelen zwischen 18-45kD. Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine kommen also verschiedene Arten von Trenngelen (Gele mit konstantem Acrylamid-Bis-Verhältnis oder Gradientengele mit unterschiedlichem Bis-Anteil) und Acrylamidkonzentrationen zur Anwendung.

Da das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine ERK1/2 mit 44kD (ERK1) und 42kD (ERK2) bekannt war, kam ein homogenes 10%iges Trenngel zur Anwendung (Eckert, 1996).

#### **4.3.3.2 Herstellung von Trenngel und Sammelgel**

Für die Elektrophorese wurden zwei Minigele, bestehend aus einem Trenngel mit 10% Acrylamid und einem Sammelgel mit 5% Acrylamid, hergestellt. Das Trenngel wurde mit 33 $\mu$ l APS und 8,3 $\mu$ l TEMED angesetzt, 4mal hin und her geschwenkt und sofort zwischen die Gelgießplatten bis ca. 1,5cm unterhalb des Glasplattenrandes pipettiert. Mit ddH<sub>2</sub>O wurde bis zum Plattenrand aufgefüllt, um die Austrocknung des Gels zu verhindern. Nach etwa 35min war die Polymerisation abgeschlossen und man konnte eine Trennlinie zwischen Trenngel und ddH<sub>2</sub>O sehen. DDH<sub>2</sub>O wurde abgekippt und 5ml Sammelgel mit 25 $\mu$ l APS und 5 $\mu$ l TEMED hergestellt. Nach

Schwenken des Sammelgels wurde dies auf das Trenngel bis zum Plattenrand gegossen und ein Plastikkamm für die Taschen in das Sammelgel bis ca. 0,5cm oberhalb des Trenngels hineingeschoben. Nach etwa 15min war es polymerisiert. Der Kamm wurde herausgenommen und die Taschen mit ddH<sub>2</sub>O gespült oder die Gele wurden mit der Gelgießkammer mit einem feuchten Tuch eingepackt und bis zum nächsten Tag im Kühlschrank gelagert. Die Glasplatten wurden mit dem Gel in die Gelelektrophorese eingebaut und Laufpuffer in die innere und äußere Kammer gefüllt.

Material: Trenngelpuffer	13,6g Tris und 0,3g SDS in 50ml ddH <sub>2</sub> O lösen, mit 1 N HCl auf pH 8,8 einstellen und mit ddH <sub>2</sub> O auf 100ml auffüllen und filtrieren.
Sammelpuffer	3g Tris und 0,2g SDS in 50ml ddH <sub>2</sub> O lösen, mit 5 N HCl auf pH 6,8 einstellen und mit ddH <sub>2</sub> O auf 100ml auffüllen und filtrieren.
Ammoniumpersulfat (APS)	1g APS in 10ml ddH <sub>2</sub> O lösen.
Acrylamid	30%ige Acrylamidstammlsg. mit 0,8% Bisacrylamid.
Trenngel (2 Minigele)	3,33ml Acrylamid; 3,3ml ddH <sub>2</sub> O; 3,33ml Trenngelpuffer; 33µl APS und 8,3µl TEMED.
Sammelgel (2 Minigele)	1,76ml Acrylamid-Bis, 3,2ml ddH <sub>2</sub> O und 5ml Sam-5ml Sammelpuffer. Aus dem Gemisch 5ml entnehmen und mit 25µl APS und 5µl TEMED ansetzen.
Laufpuffer	3,0g Tris, 14,4g Glycin und 1,0g SDS in 1000ml ddH <sub>2</sub> O lösen und auf pH 8,8 einstellen.

#### 4.3.3.3 Elektrophorese

Nach Berechnung der erforderlichen Proteinmenge aus den Lysatproben wurden jeweils 50µg Protein der Proben mit dem Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Dabei war es sehr wichtig, genau zu pipettieren, da die ERK1/2-Aktivierung quantitativ ausgewertet wurde. Zu 1µl Protein-Standard wurden 19µl Probenpuffer pipettiert. Das Gemisch wurde 5min bei 80°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und anschließend mit einer Hamilton-Spritze vorsichtig in die Geltaschen zu pipettieren. In jeder Tasche befanden sich der Proteinstandard oder je 50µg Protein der Proben. Die Elektrophorese wurde mit 50V/35mA gestartet. Erst nachdem die Proben vollständig in das Trenngel eingetreten oder besser, wenn sie ungefähr bis zur Hälfte des Trenngels gewandert sind, wurde die Spannung auf 110V

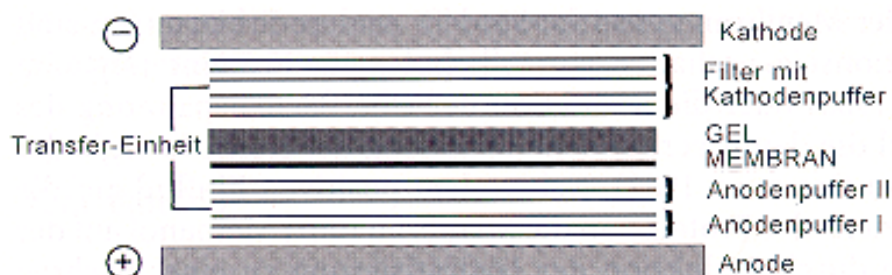
erhöht, damit keine Proteine verloren gehen und die Spannung nicht zu früh zu hoch gestellt wird. Dadurch, dass der Probenpuffer blau ist, kann man erkennen, bis zu welcher Strecke die Proteine im Trenngel aufgetrennt wurden. Sobald die Farbfront die untere Gelebene erreicht hat, wurde das Gerät ausgeschaltet und das Gel in Transferpuffer gelegt.

Material:	SDS-Probenpuffer	1,5g Tris, 2g SDS, 10g Glycerin, 37mg EDTA und 2ml DDT aus 1M Stammsg.. In 50ml ddH <sub>2</sub> O lösen, mit 1 N HCl auf pH 6,8 einstellen, 2ml Bromphenolblau-Stammsg. (0,5 % in ddH <sub>2</sub> O) dazugeben und auf 100ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen.
	Laufpuffer	
	Transferpuffer	3,0g Tris, 14,4g Glycin und 200ml Ethanol (96 %) mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000ml auffüllen.
	Proteinstandard SDS-PAGE	
	Elektrophorese	
	Power Supply (Stromquelle)	

#### **4.3.4 Western Blotting (Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Trägermembranen)**

##### **4.3.4.1 Grundlagen**

Die aufgetrennten Proteine werden aus dem Gel auf eine synthetische Membran übertragen, sodass ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters entsteht und die Proteine mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen sind. Durchgeführt wurde das *Semi-Dry-Blotting*-Verfahren nach Kyse-Andersen. Diese Methode funktioniert mit dem Gel-Membran-Sandwich zwischen horizontalen Plattenelektroden und ist deshalb *Semi-Dry*, weil die Puffermenge auf getränkte Filterpapiere zwischen den Elektroden und dem Transfersandwich begrenzt ist. Aufgrund der Geometrie und des geringen Abstandes der Elektroden sind relativ starke und homogene elektrische Felder bei geringer Stromstärke und Leistung erreichbar (Eckert, 1996).



**Abb. 4.5:** Querschnitt durch den Aufbau einer Transfer-Einheit in einem *Semi-Dry-Blotting*-Gerät.

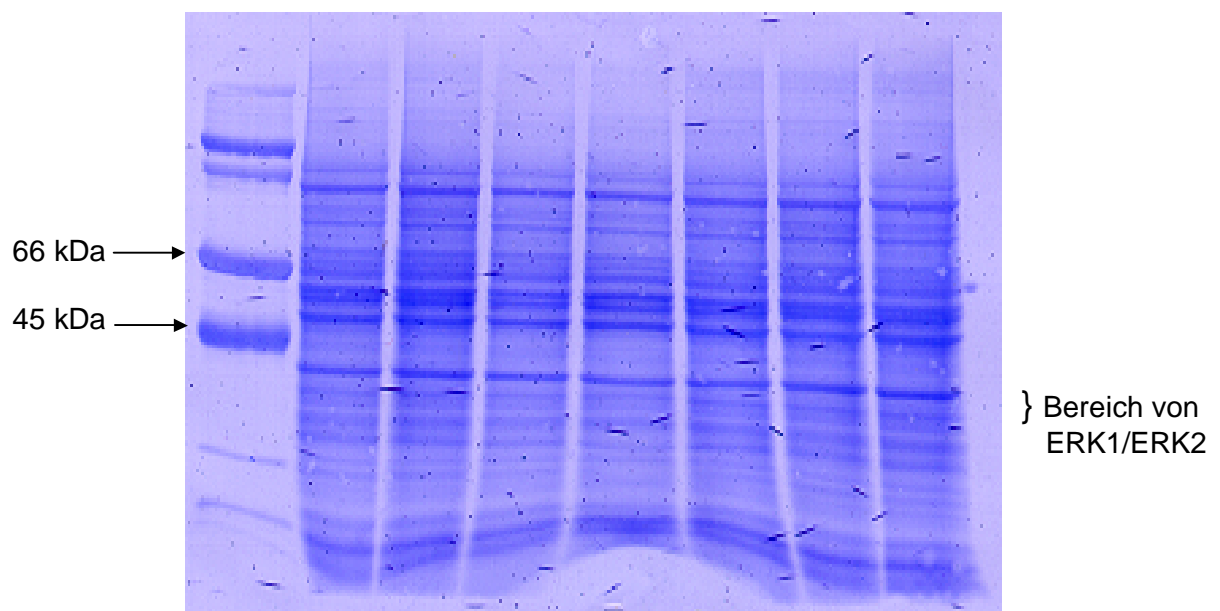
PVDF-Membranen (Polyvinylidendifluorid) haben eine sehr hohe Proteinbindekapazität (bis zu  $600 \text{ mg/cm}^2$ ) und ein gutes Signal/Hintergrund-Verhältnis mit Chemilumineszenz-Detektionssystemen. Nachteil ist die stärkere Tendenz zu unspezifischen Hintergrundreaktionen mit dem Nachweisreagenz (Gentechn. Methoden, 2002). PVDF ist ein Teflon-Typ Polymer, der durch dipolare und hydrophobe Wechselwirkungen mit Proteinen nicht kovalent reagiert (Dunbar, 1994). Die Qualität des zu blottenden Proteins ist für das Gelingen eines Protein-Blotting von größter Bedeutung. Proben mit degradierten Proteinen können bei Trennung nach der Molmasse auf dem Blot weitere Banden von geringerer Masse liefern. Eine Aussage, ob es sich in solch einem Fall um Abbauprodukte des entsprechenden Proteins oder um eine Kreuzreaktion handelt ist nicht möglich (Gentechn. Methoden, 2002).

#### 4.3.4.2 Durchführung

Für den Blot wurde die PVDF-Membran verwendet, die vor dem Blotten bis zu 15sec in Methanol getränkt und dann je 5min in ddH<sub>2</sub>O und Transferpuffer gegeben wurde. Dabei war darauf zu achten, dass die Membran mit Methanol überall gut durchtränkt wurde. Filterpapiere wurden ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Auf drei übereinander liegende Filterpapiere wurde die Membran (anodenseitig) gelegt, dann das Gel und darüber wieder 3 Filterpapiere nach dem „Sandwich“-Prinzip, wobei kein Einschluß von Luftblasen auftreten darf. Geblottet wurde 70min lang mit

20V/250mA. Nach dem Transfer erfolgte die Färbung der Membran für 30sec im Coomassie-Farbreagenz und anschließend die Entfärbung mit Coomassie-Destaining für etwa 5min, bis die blauen Banden sichtbar wurden. Nach Einscannen der Membranen wurden die Banden des Proteinstandards abgeschnitten und die Membran in Methanol gewaschen, um die blau gefärbten Proteinbanden wieder zu entfernen, damit letztendlich nach dem Immunoblot nur die Banden der zu untersuchenden Proteine zu sehen sind.

Material: PVDF-Membran (0,2µm Porengröße)  
Filterpapier  
Transferpuffer  
Biometra Fast Blot  
Coomassie-Farbreagenz 40ml Methanol, 2ml Essigsäure,  
0,2g Coomassie-Brilliantblau R250,  
auf 100ml auffüllen und filtrieren.  
Coomassie-Entfärbelsg. 50% Methanol, 1% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O.



**Abb. 4.6: PDVF-Membran nach Coomassie-Färbung.**



### 4.3.5 Nachweis von ERK1/2

#### 4.3.5.1 Grundlagen

Proteine besitzen meist zahlreiche verschiedene antigene Determinanten (Epitope), mit denen dagegen gerichtete Antikörper über entsprechende Bindungsstellen (Paratope) in Wechselwirkung treten. Die räumlichen Strukturen und Ladungsverteilungen zwischen Epitop und Paratop sind einander komplementär und passen zueinander nach dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“. Polyklonale Antiseren enthalten Antikörper gegen verschiedene Epitope eines komplexen Antigens, so daß es je nach Bedingungen zu bi- und multivalenten Bindungen zwischen Antikörpern und Antigenmolekülen kommt. Monoklonale Antikörper erkennen nur eine einzige antigene Determinante und bilden trotz gleicher Affinität wie polyklonale Antikörper mit den Antigenen einen weniger stabilen Komplex. Der immunologische Nachweis mit Antikörpern ist indirekt und erfolgt in zwei oder mehr Schritten:

1. Bindung eines unmarkierten Primärantikörpers an das Antigen
2. Bindung eines markierten Sekundärantikörpers
3. Anwendung der alkalischen Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Technik

Vorteil der indirekten Methode ist, daß meist eine Verstärkung des Signals erreicht werden kann.

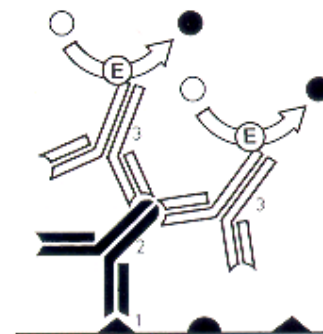
Polyklonale Antiseren enthalten neben max. 25-30% an spezifischen Antikörpern überwiegend unspezifische Immunoglobuline bezogen auf das Antigen. Dadurch kann es zu unspezifischen Reaktionen mit anderen Proteinen kommen, aber auch zufällige Kreuzreaktionen der spezifischen Antikörper mit Epitopen auf anderen Proteinen können auftreten. Verdünnung des Antiserums, „Blockierungslösungen“ und stringentes Waschen können diese Bindungen meist minimieren. Auch monoklonale

Antikörper können Kreuzreaktionen eingehen. Da die Proteine durch SDS-PAGE oft denaturiert sind, binden nur solche Antikörper, die denaturierungsresistente oder konformationsunabhängige (sequentielle) Epitope erkennen. Damit besteht die Gefahr, daß ihr spezifisches Epitop durch Denaturierung zerstört wird. In polyklonalen Seren sind solche Antikörper praktisch immer enthalten.

Die Sensitivität der indirekten immunologischen Nachweismethode ist abhängig vom Titer der Primär- und Sekundärantikörper sowie von der Empfindlichkeit des Detektionssystems (Eckert, 1996).

Es werden zwei Antikörper verschiedener Spezies verwendet, im ersten Schritt ein Primärantikörper, der an das Antigen (Protein) auf der Membran bindet und im zweiten Schritt ein Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet. Der Sekundärantikörper ist an das Enzym, hier eine alkalische Phosphatase, oder an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, über den die Bindung sichtbar gemacht wird. Da mehr als ein Sekundärantikörper an ein Primärkörper binden kann wird das Signal zusätzlich verstärkt (Gentechn.Methoden, 2002).

**Abb. 4.7:** Schematische Darstellung des indirekten Immunnachweises mit Sekundärantikörper-Enzymkonjugaten. Der un-markierte Primärantikörper (2) bindet an das spezifische Antigen auf der Blot-Membran (1). Die enzymmarkierten Sekundärantikörper (3) erkennen verschiedene Epitope auf dem F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers und können deshalb in Mehrzahl an diesen binden. Symbolisch angedeutet ist die enzymatische Umwandlung (E) eines farblosen Chromogens in einen Farbniederschlag.



#### 4.3.5.2 Durchführung

Für den Nachweis von ERK1/2 wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen
2. Zugabe von Primärantikörper (monoklonal)
3. Zugabe von Sekundärantikörper (polyklonal)
4. colorimetrischer Nachweis mittels BCIP/NBT

##### 4.3.5.2.1 Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen

Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden, müssen vor dem immunologischen Nachweis die unspezifischen Bindungsstellen möglichst vollständig abgesättigt (blockiert) werden. Das ideale Agens, welches die unspezifischen Bindungsstellen vollständig blockiert, ohne das spezifische Signal zu beeinflussen, ist bis heute noch nicht gefunden.

#### *Durchführung*

Die Membran wurde 1h in Blockierungslösung bei RT auf dem Rüttler inkubiert und anschließend 5min in TBS gewaschen.

Material:	TBS	8g NaCl, 0,2g KCl und 2g Tris in 800ml ddH <sub>2</sub> O lösen, pH 7,4 einstellen und auf 100ml auffüllen.
	Blockierungslösung	5% BSA und 0,1% Tween 20 in TBS.

##### 4.3.5.2.2 Primärantikörper

Mit einer Verdünnung von 1:15 000 wurde die Membran mit einem Anti-MAP-Kinase-AK (gegen phosphorylierte ERK1/2) in einer Blockierungslösung inkubiert. Zunächst wurde die Membran unter Lichtabschluß 30min bei RT auf dem Rüttler (40/min) inkubiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Membran 30-60min bei RT auf den Rüttler gegeben und dann 3mal mit TBST gewaschen.

Material:	TBST	0,1% Tween 20 in TBS
	Blockierungslösung	0,1% BSA in TBST
	monoclonal Anti-MAP-Kinase	in verd. 1:15 000 in Blockierungslsg.
	(diphosphorylated ERK1/2)	

#### **4.3.5.2.3 Sekundärantikörper**

Der Sekundärantikörper wurde in TBST 1:1 500 verdünnt und die Membran darin 1h bei RT auf dem Rüttler (40/min) inkubiert. Die Membran wurde 1 mal 10min mit TBST und 3mal 10min mit TBS gewaschen.

Material:	TBST	
	Mouse Immunoglobulins/AP	Verd. 1:1 500 in TBST
	(anti-Mouse-IgG AP)	

#### **4.3.5.2.4 Colorimetrischer Nachweis der alkalischen Phosphatase**

Die chemische Kopplung des Sekundärantikörpers mit alkalischer Phosphatase macht es möglich, Proteine indirekt durch chromogene Substanzen nachzuweisen. Der sensitivste colorimetrische Nachweis von alkalischer Phosphatase auf Blot-Membranen gelingt mit den chromogenen Substraten BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazolium). Die alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung des Phosphatrestes von BCIP und wandelt es in das entsprechende Indoxylderivat um. Das Indoxylderivat wird durch NBT oxidiert und dimerisiert zu dem tiefblauen unlöslichen 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo. NBT wird dabei zu einem purpurfarbenem Diformazan reduziert und verstärkt so die Intensität des Farbniederschlages (Franci und Vidal, 1988), (Eckert, 1996).

#### ***Durchführung***

Die Membran wurde nach dem Waschen mit BCIP/NBT-Färbelösung angefärbt. Dazu wurde die Membran auf den Rüttler gestellt und so lange inkubiert, bis deutlich angefärbte Banden zu sehen waren. Mit einer EDTA-Lösung wurde die Redoxreaktion abgestoppt und die Membran getrocknet.

Material:	BCIP-Stammlösung	0,5g BCIP in 10ml 100% Dimethylformamid.
	NBT-Stammlösung	0,5g NBT in 10ml 70% Dimethylformamid.
	AP-Puffer	100mM NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> und 100mM Tris in 800ml ddH <sub>2</sub> O lösen, mit 1 NHCl pH 9,5 einstellen und auf 1l auffüllen.
	TBS	
	EDTA-Stopplösung	20mM EDTA in TBS.
	Färbelösung	66µl NBT-Stammlsg, 10ml AP-Puffer, 33µl BCIP-Stammlsg.

#### 4.4 Aktivatoren und Inhibitoren

Um Näheres über die an der Aktivierung von ERK1/2 beteiligten Signalkaskaden und deren Substrate zu erfahren, wurden MG-63 mit TPA als Aktivator und parallel dazu mit verschiedenen Inhibitoren vor mechanischer Dehnung behandelt. Zu nennen sind die Inhibitoren BAPTA AM cell permeant, Gö 6976 und Gö 6983. Es wurde untersucht, welchen Einfluß diese Inhibitoren auf die ERK1/2-Aktivierung im Rahmen der mechanischen Dehnung haben. Es war dabei auch zu klären, welchen Effekt die Inhibitoren in nicht gedehnten Zellen haben.

In Vorversuchen wurden die Zellen nach mechanischer Dehnung mit 4000µstr, 30 Zyklen und 1 Hz unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert, um die Zeit mit maximaler Aktivierung von ERK1/2 zu bestimmen. Mit der 12. Zellpassage wurde ein Wiederholungsversuch durchgeführt. Anschließend konnte mit den Inhibitorexperimenten begonnen werden, wobei die Inkubationszeit nach der Dehnung entsprechend der Zeit maximaler ERK1/2-Aktivierung war. Die Zellen wurden 18h zuvor in serumfreiem Medium inkubiert und vor der Dehnung mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren behandelt. Als Kontrolle dienten ungedehnte Zellen.

#### 4.4.1 Effekt von TPA

TPA (Phorbol-12-myristat-acetat) ist ein Tumorpromotor, der an die C1-Domäne der PKC bindet. Dabei kommt es zur verringerter Autoinhibition der PKC und zusammen mit Calcium und der Pseudosubstratdomäne zu Affinitätswechselwirkungen zwischen PKC und Membran. TPA dient dabei als hydrophober Anker, so daß die PKC zur Membran transloziert werden kann (Newton, 1995).

TPA induziert über EGF-Rezeptoren und PKC die Phosphorylierung von ERKs (Chen, 2001) und aktiviert ebenfalls über PKC die JNK-Kaskade (Chen, 2002).

TPA aktiviert folgende Isoformen der PKC: cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta_{1,2}$ ,  $\gamma$ ) und nPKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) (Wenzel-Seifert, 1994) und bewirkt eine Autophosphorylierung der PKC $\mu$  mit daraus resultierender Aktivierung von PKC $\mu$  (Gschwendt, 1996). PKC ist der Hauptrezeptor für Phobolester und als deren Hauptsubstrat offensichtlich für die TPA-induzierte MEK- und ERK-Aktivierung verantwortlich. TPA bewirkt die Aktivierung von MEK1 und Koexpression von c-Raf, was zur Aktivierung von ERK führt. Überexprimierung der PKC $\delta$  in COS und NIH3T3 Zellen aktiviert MEK1 mit erhöhter Aktivierung durch die PKC-Mutante und ERK1 (Ueda, 1996).

TPA diente als Kontrolle für die Aktivierbarkeit von ERK bei einer Konzentration von 100nM und Inkubationszeit von 30min.

#### 4.4.2 Effekt von BAPTA AM

**BAPTA AM** 126150-97-8 Glycin, N,N'-[1,2-ethandiylobis(oxy-2,1-phenyl)]bis [N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]]-, bis[(acetyloxy)methyl]ester ist der Ester von BAPTA. BAPTA bildet mit intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> einen Komplex und wirkt im Vergleich zu EGTA und EDTA spezifischer auf Ca<sup>2+</sup> (Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals).

Bei der integrinvermittelten mechanischen Signaltransduktion von osteoblastischen Zellen reguliert  $\text{Ca}^{2+}$  die Bindung zwischen aktivierten (tyrosinphosphorylierten) Ankerproteinen und dem Zytoskelett (Schmidt, 1998).

Um die Zellen auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der ERK1/2-Aktivierung hin zu untersuchen, wurde BAPTA AM mit 20 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$  und 150 $\mu\text{M}$  30min inkubiert.

#### 4.4.3 Effekt von Gö 6976

**Gö 6976** 12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indol [2,3-a]pyrrol[3,4-c]-carbazol ist ein Inhibitor der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ) (Calbiochem) bzw. der cPKC $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$  ( $\text{IC}_{50}$  im nM-Bereich). nPKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ) und aPKC( $\xi$ ) werden im  $\mu\text{M}$ -Bereich gehemmt (Angaben von Calbiochem:  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und  $\xi$ -Isoenzyme werden auch im  $\mu\text{M}$ -Bereich nicht gehemmt). Interessanterweise wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige PKC $\mu$  gleichermaßen gut gehemmt (Gschwendt, 1996).

Die Zellen wurden 1h mit 100nM, 500nM, und 1000nM vor der Dehnung und zeitgleich dazu die Kontrollen (ohne Dehnung) inkubiert.

#### 4.4.4 Effekt von Gö 6983

**Gö 6983** 2-(1H-indol-3-yl)-3-[1-(3-dimethylaminpropyl)-1H-indol-3-yl]maleinimid ist ein Inhibitor der PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\xi$  ( $\text{IC}_{50} \leq 60 \text{ nM}$ ) und PKC $\mu$  ( $\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$ ). Gö 6983 wird eingesetzt, um PKC $\mu$  von anderen PKC-Isoformen zu differenzieren (Gschwendt, 1996).

Die Zellen wurden 1h mit 150nM, 300nM und 600nM vor der Dehnung und zeitgleich dazu die Kontrollen (ohne Dehnung) inkubiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 MTT-Zellproliferationsassay

#### 5.1.1 Grundlagen

Um die Stoffwechselaktivität von Zellen bestimmen und damit Rückschlüsse auf die Proliferationsrate ziehen zu können, wurde der MTT-Zellproliferationstest nach Mosmann (Mosmann, 1983) durchgeführt. Mit Hilfe des Tests sollte überprüft werden, ob MG-63-Zellen überhaupt mechanosensitiv sind, um sie dann im Hinblick auf ihre ERK1/2-Aktivierung genauer untersuchen zu können. Es wurden dazu zwei Hypothesen gefordert ( $H_0$  und  $H_1$ ).  $H_0$  besagt, daß mechanische Dehnung keinen Einfluß auf die Zellen hat,  $H_1$  fordert, daß die Zellen mechanosensitiv sind.

MG-63 Osteosarkomzellen der 5. Passage wurden mit einer Konzentration von 60 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 96-Well-Platten ausgesät und in zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 4000  $\mu$ str und 30 Zyklen bei 1 Hz gedehnt. Am vierten Tag erfolgte die photometrische Messung. Extinktionen der Kontrollen (ungedehnte Zellen) wurden mit denen von gedehnten Zellen verglichen.

#### 5.1.2 Ergebnisse

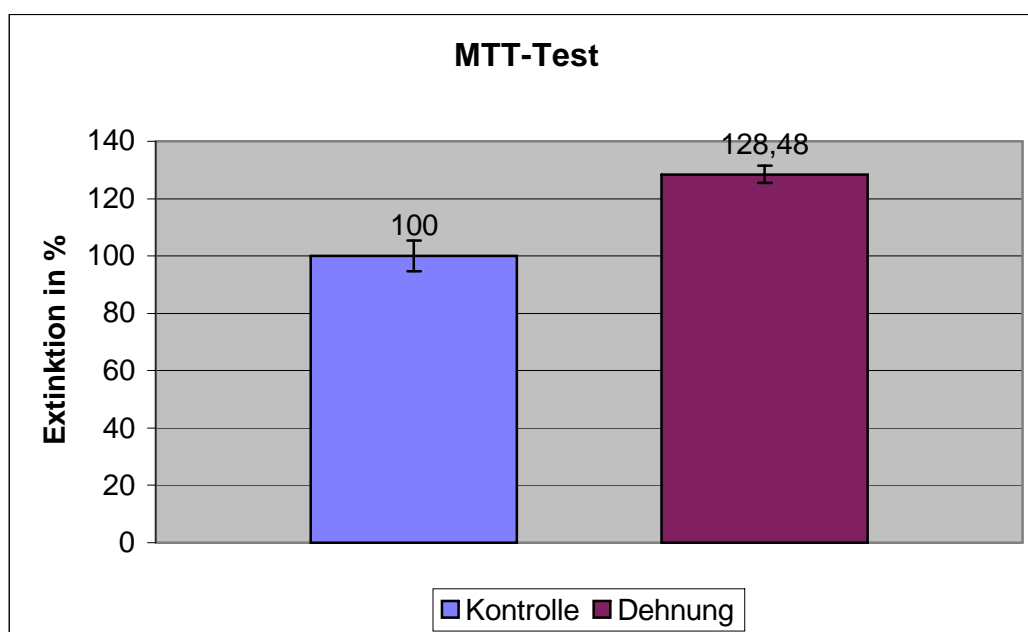
Die Extinktionswerte bei 580nm der Positiv- und Negativ-Kontrollen werden in einer Rangliste nach aufsteigenden Werten angeordnet.  $R_x$  und  $R_y$  sind die Rangsummen. Der U-Test von Mann-Whitney berechnet den unteren und oberen kritischen Wert und trifft eine Aussage über die Signifikanz der gemessenen Werte. Liegt der teststatistische Wert  $T$  über der oberen kritischen Grenze  $\alpha = 0,05\%$ , so wird  $H_0$  verworfen und  $H_1$  angenommen.



	<b>Kontrolle</b>		<b>Dehnung</b>	
	<b>Extinktion</b>	<b>Rangliste</b>	<b>Extinktion</b>	<b>Rangliste</b>
	0,394	<b>1</b>	0,562	<b>10</b>
	0,531	<b>7</b>	0,557	<b>9</b>
	0,416	<b>2</b>	0,636	<b>16</b>
	0,484	<b>6</b>	0,632	<b>15</b>
	0,447	<b>4</b>	0,606	<b>12</b>
	0,547	<b>8</b>	0,608	<b>13</b>
	0,433	<b>3</b>	0,580	<b>11</b>
	0,481	<b>5</b>	0,615	<b>14</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>0,466625</b>		<b>0,5995</b>	
<b>Standardabweichung</b>	<b>5,41%</b>		<b>3,01%</b>	
<b>Extinktionsdifferenz</b>	<b>28,48%</b>			
<b>Testgröße T=UX</b>	64			
<b>UY</b>	0			

**Tabelle 5.1:** Extinktionswerte der gedehnten Zellen und einer Negativ-Kontrolle von MG-63 Zellen der 5. Passage. Aufgrund der geringen Zellkonzentration je Well wurde stichprobenmäßig aus 1 Well pro Platte die Zellzahl bestimmt, um zu überprüfen, inwieweit die Zellkonzentration vom Sollwert abweicht. Daher sind jeweils nur 8 statt 9 Werte in der Tabelle angegeben.

Die Stoffwechselaktivität von MG-63 im Vergleich zu nicht gedehnten Zellen nimmt um 28,48% zu.



**Abb. 5.1:** Nach mechanischer Belastung nimmt die Stoffwechselaktivität von MG-63 Osteosarkomzellen nach der 5. Passage um 28,48% zu. Die Dehnung erfolgte an Tag 2 und 3 mit jeweils 4000 $\mu$ str, 30 Zyklen und 1 Hz.

Die folgenden Seiten zeigen die Ergebnisse des Immunoblottings nach dem Western-Blot-Verfahren.

Nachdem genügend MG-63 mit RPMI-1640-Medium (mit 10% FCS) herangezchtet wurden, konnten 500 000 Zellen/Poykarbonatdehnungsplatte ausgesät und am nächsten Tag nach Erreichen von semikonfluentem Wachstum ein Mediumwechsel mit je 5ml serumfreiem Medium durchgeführt werden. Nach Versuchsdurchführung wurden die Zellen lysiert und nach dem Bradford-Assay die Proteinkonzentrationen der Lysatproben bestimmt. Jeweils 50 $\mu$ g der Lysatproben und ein Proteinstandard wurden in die Geltaschen gegeben und in einem 10%igen SDS-PAGE-Trenngel mit 110V aufgetrennt. Der Proteinstandard diente dabei der Zuordnung der Proteinbanden zu Molekulargewichtseinheiten. Mit einem Westernblot wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, welche anschließend in eine Blockierungslösung gegeben wurde, um unspezifische Bindungsstellen möglichst vollständig abzusättigen. Mit dem Primärantikörper Anti-MAP-Kinase (activated) (Verd. 1:15 000, Inkubat. über

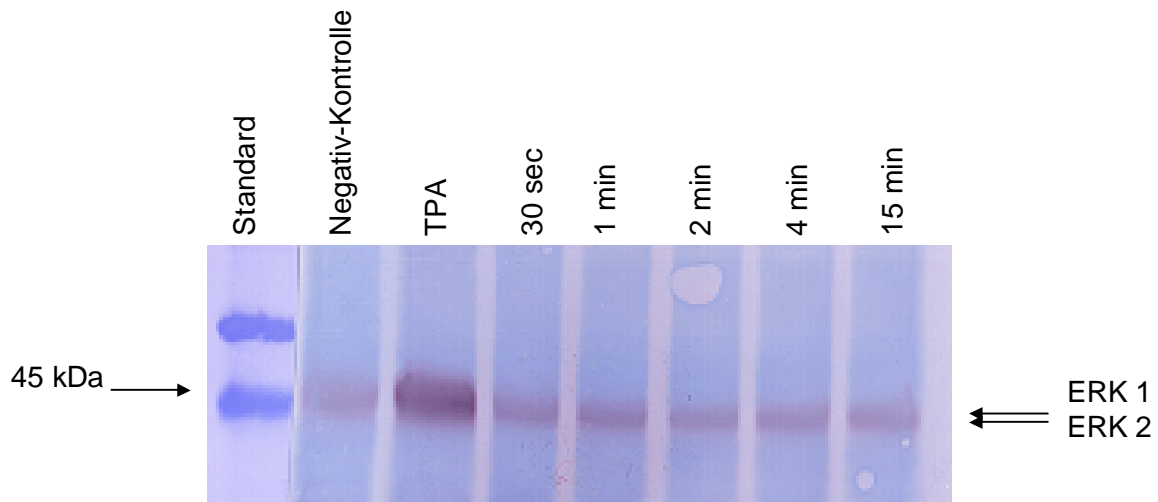
Nacht) und konjugiertem Sekundärantikörper Anti-mouse/AP (Verd. 1:1 500, Inkubat. 1h) wurde die Membran inkubiert und mit BCIP/NBT als colorimetrischer Nachweis von ERK1/2 gefärbt.

## **5.2 Mechanische Dehnung von MG-63-Osteosarkomzellen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten**

Als Vorversuch sollte die Inkubationszeit mit maximaler Aktivierung von ERK1/2 nach mechanischer Belastung bestimmt werden.

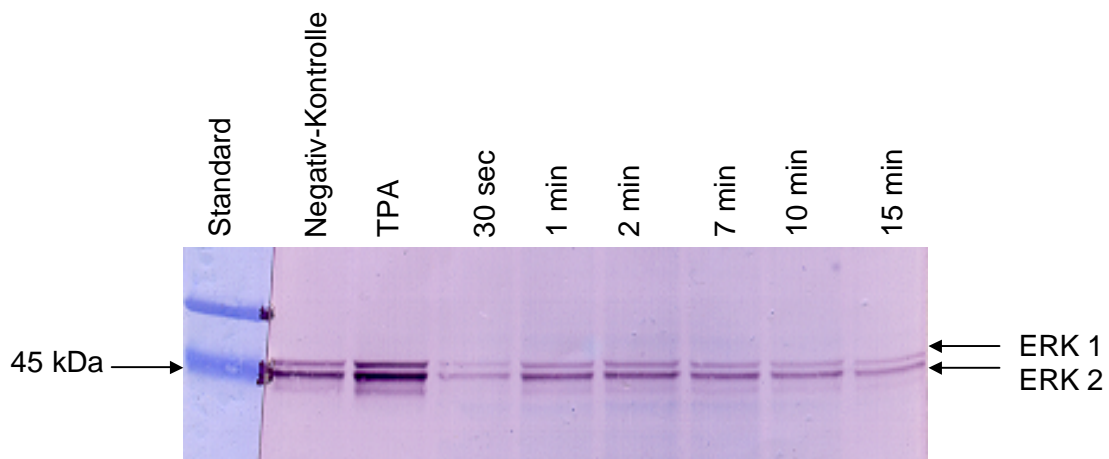
Die Positiv-Kontrolle wurde mit 100nM TPA 30min inkubiert, die restlichen Platten wurden außer der Negativ-Kontrolle mit 4000 $\mu$ str, 30 Zyklen und 1 Hz mit der selbst entwickelten „4-Punkt-Dehnungsmaschine“ gedehnt. Im Anschluß daran wurden die Platten unterschiedlichen Inkubationszeiten ausgesetzt: 30sec, 1min, 2min, 4min, 7min, 10min und 15min und dann lysiert. Mit der 12. Zellpassage wurde der Versuch einmal wiederholt.

### 5.2.1 Aktivierung von ERK1/2 durch mechanische Dehnung



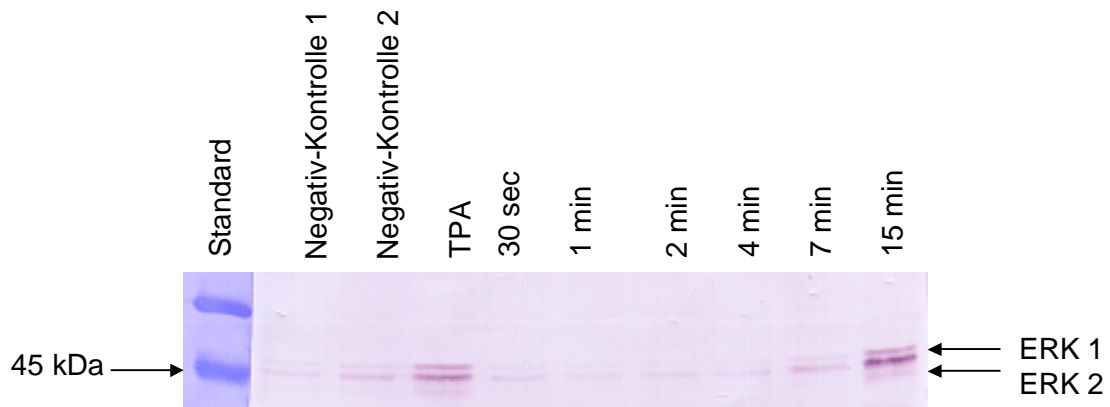
**Abb. 5.2:** 3. Zellpassage. Nach mechanischer Dehnung maximale ERK1/2-Aktivierung erkennbar nach einer Inkubationszeit von 1min

3. Zellpassage. Der Versuch wurde mit dieser Zellpassage einmal durchgeführt. Leider konnten die Banden von ERK1/2 nicht sichtbar elektrophoretisch aufgetrennt werden und sind nur als jeweils unscharfe dicke Bande zu erkennen. Das Ergebnis wurde deshalb miteingebracht, da es die ERK-Aktivierung von Zellen der 3. Passage zeigt. Zu erkennen ist eine kaum nachweisbare ERK1/2-Aktivität der Negativ-Kontrolle neben einer sehr starken Aktivierung nach Behandlung mit TPA und einer Zunahme der Aktivität durch Dehnung. Bereits 30sec nach Dehnung kommt es zu einer Aktivitätszunahme mit einem Maximum nach 1min, danach nimmt sie bis 15min wieder leicht ab. Die Aktivierung ist nach 2, 4, und 15min etwa gleich stark, jedoch etwas geringer als nach 30sec. Das Ergebnis zeigt ein ähnliches Aktivierungsmuster wie das der Osteoblasten, die von Jürgen Leitsch untersucht wurden. Er konnte zeigen, daß nach 30sec die ERK1/2-Aktivität leicht ansteigt mit einem Maximum nach 1min, welche nach 2min wieder abnimmt. Die gedehnten Zellen zeigen hierbei auch nach 30sec, 1min, 2min, 7min und 20min eine höhere Aktivität der ERK1/2 als ungedehnte (Negativ-Kontrolle).



**Abb. 5.3:** 9. Zellpassage. Durch Dehnung wird die ERK1/2-Aktivität herunterreguliert mit einer hier dargestellten stärksten Aktivitätsabnahme nach 30sec und einer geringsten Abnahme nach 2min. Auffällig ist eine deutliche ERK1/2-Grundaktivität der Negativ-Kontrolle sowie die stets höhere Aktivität der ERK2.

9. Zellpassage. Mit dieser Zellpassage erfolgte eine einmalige Versuchsdurchführung. Es zeigt sich eine deutliche ERK1/2-Grundaktivität der ungedehnten Zellen. Ähnlich wie bei Abb. 5.2 nimmt die Aktivität von ERK1/2 in gedehnten Zellen von 30sec über 1min bis 2min zu, um dann kontinuierlich bei 7, 10 und 15min wieder abzunehmen, wobei jedoch die Grundaktivität stets höher ist als die durch mechanische Belastung hervorgerufene Änderung der ERK1/2-Aktivität. Die Dehnung bewirkt eine Herunterregulierung der ERK1/2-Aktivität, die hier nach 30sec am stärksten und nach 2min am geringsten ist. Auffällig ist die stärkere Aktivierung der ERK2 im Vergleich zu ERK1.



**Abb. 5.4:** 12. Zellpassage. Schwache ERK1/2-Grundaktivität der Negativ-Kontrollen. Starke Aktivierung der ERK1/2 nach 15min.

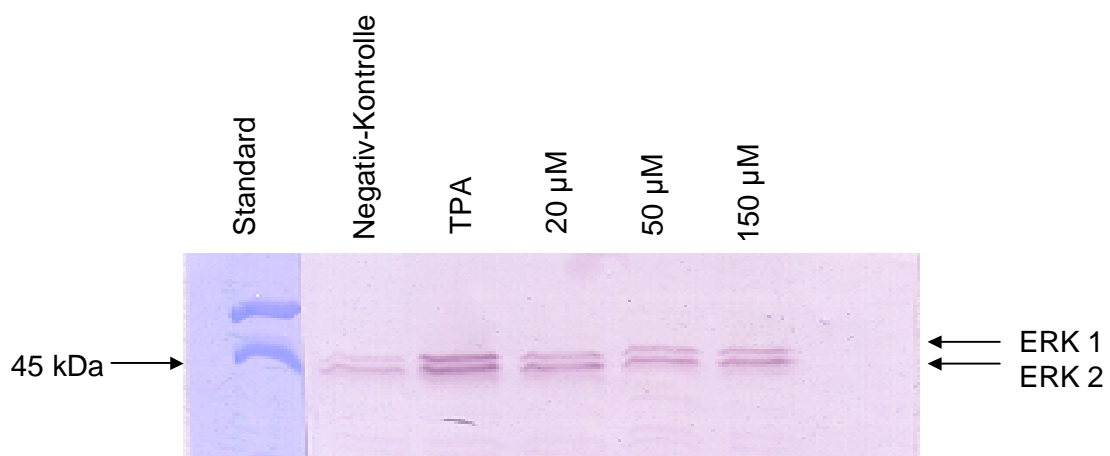
12. Zellpassage. Ein interessantes Ergebnis zeigt hier Abb. 5.4, da erst nach einer Inkubationszeit von 15min eine deutliche ERK1/2-Aktivitätszunahme zu erkennen ist, welche auch deutlich stärker ist als die Grundaktivität.

Es erfolgte eine zweimalige Versuchsdurchführung mit dieser Zellpassage. Der Vergleich der Ergebnisse zeigte dabei ein identisches ERK1/2-Aktivierungsmuster sowie jeweils eine gleich starke Aktivität der jeweiligen Banden.

### 5.3 Versuche mit BAPTA AM

#### 5.3.1 Aktivierung von ERK1/2 durch BAPTA AM in nicht gedehnten Zellen

Die Zellen wurden 30min mit 100nM TPA behandelt, die anderen 30min mit 20µM, 50µM oder 150µM BAPTA AM. BAPTA AM bindet  $\text{Ca}^{2+}$  durch Komplexbildung.

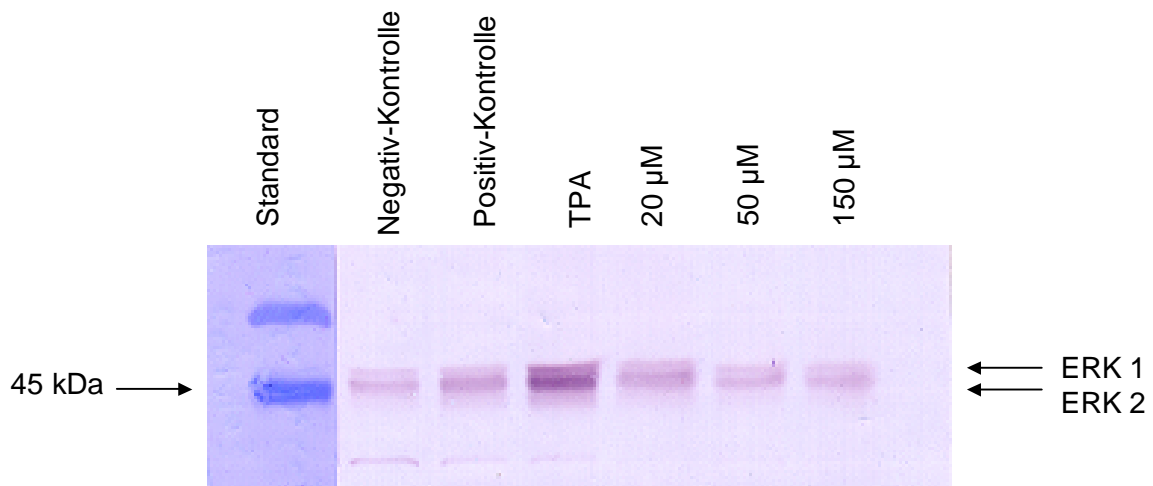


**Abb. 5.5:** BAPTA AM bewirkt eine Aktivierung der ERK1/2 in ungedehnten Zellen.

8. Zellpassage. Die Negativ-Kontrolle zeigt die niedrigste Aktivität der ERK1/2. Obwohl die Zellen nicht gedehnt wurden und  $\text{Ca}^{2+}$  durch BAPTA AM gebunden wird, werden ERK1/2 aktiviert. Mit 20µM und 150µM BAPTA AM ist die Aktivierung am stärksten und in etwa gleich und wird bei 50µM etwas geringer. BAPTA AM wirkt auf nicht gedehnte Zellen mit einer Aktivierung von ERK1/2. Mit derselben Zellpassage ist der Versuch zweimal durchgeführt worden. Das Aktivitäts- und Aktivierungsverhalten von ERK1/2 zeigte hierbei ein gleiches Ergebnis.

### 5.3.2 Dehnungsversuch mit BAPTA AM

Die Zellen wurden mit denselben Inkubationszeiten und Konzentrationen mit TPA oder BAPTA AM behandelt und nach der Dehnung 2min inkubiert.



**Abb. 5.6:** 4. Zellpassage. BAPTA AM und Dehnung bewirken eine verminderte Aktivität von ERK1/2.

#### ***BAPTA AM und Dehnung bewirken eine verminderte Aktivität von ERK1/2***

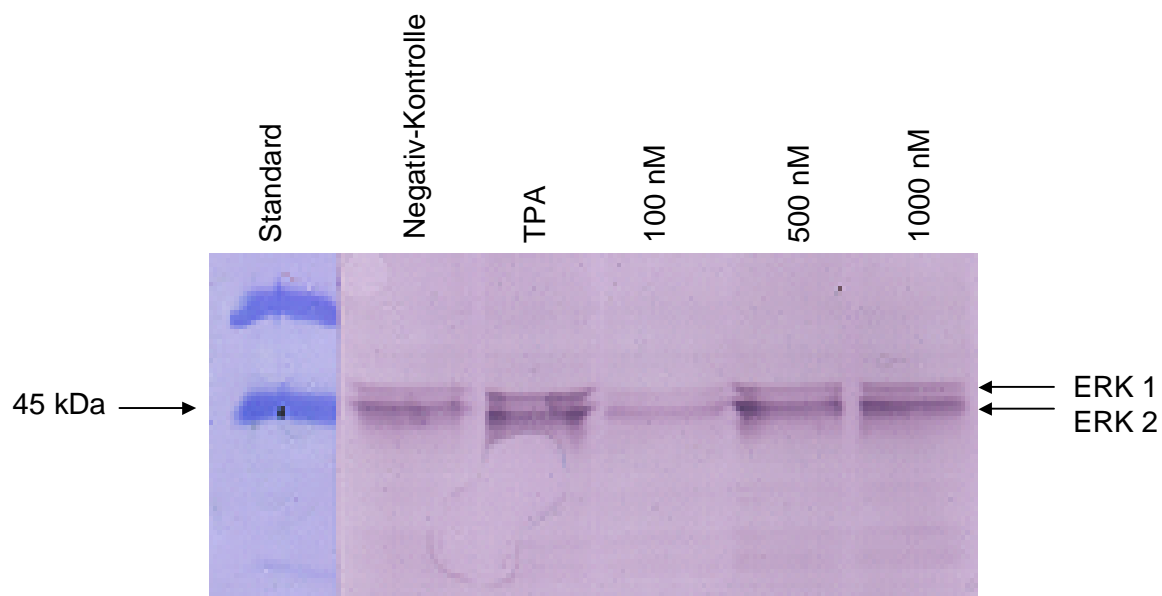
4. Passage. Es ist eine einmalige Versuchsdurchführung mit dieser Zellpassage erfolgt. Die Negativ-Kontrolle zeigt eine gewisse Grundaktivität von ERK1/2, die allein durch Dehnung ansteigt. Im Vergleich zu ungedehnten Zellen scheint die Dehnung zusammen mit einer Vorbehandlung mit 20µM, 50µM oder 150µM BAPTA AM in Bezug auf die ERK1/2-Aktivierung einen herunterregulierenden Einfluß zu haben.



## 5.4 Versuche mit Gö 6976

Die Zellen wurden mit 30min mit 100nM TPA oder 1h mit 100nM, 500nM oder 1000nM Gö 6976 inkubiert. Die Inkubation mit Gö 6976 erfolgte vor der Dehnung. Nach der Dehnung wurden die Zellen 2min inkubiert.

### 5.4.1 Stimulierender Effekt von Gö 6976 auf ERK1/2 in nicht gedehnten Zellen



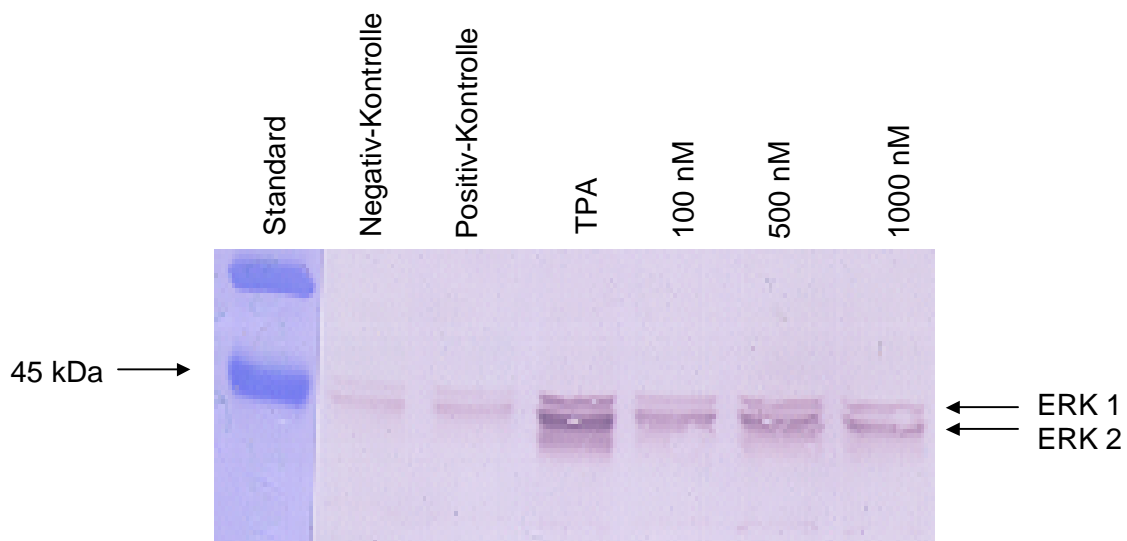
**Abb. 5.7:** 4. Zellpassage. Durch Gö 6976 mit 100nM wird die ERK1/2-Aktivität geringer und ab 500nM höher.

#### ***ERK1/2-Aktivierung durch Gö 6976 in ungedehnten Zellen durch paradoxe Aktivierung?***

4. Zellpassage. Die Negativ-Kontrolle hat bereits schon in der 4. Passage eine erhebliche ERK1/2-Grundaktivität, die sich durch TPA erhöht. Durch 100 nM Gö 6976 sinkt die Aktivität und steigt bei 500 nM wieder an, wobei die Aktivierung stärker ist als die ERK1/2-Grundaktivität. Der Versuch wurde mit dieser Zellpassage einmal wiederholt. Der Wiederholungsversuch zeigte

dabei die gleiche Aktivierungstendenz, wobei die Aktivierung bei 500nM etwas schwächer und bei 1000nM etwas stärker ist.

#### 5.4.2 Dehnungsversuch mit Gö 6976



**Abb. 5.8:** 6. Zellpassage. Gö 6976 und Dehnung aktivieren ERK1/2.

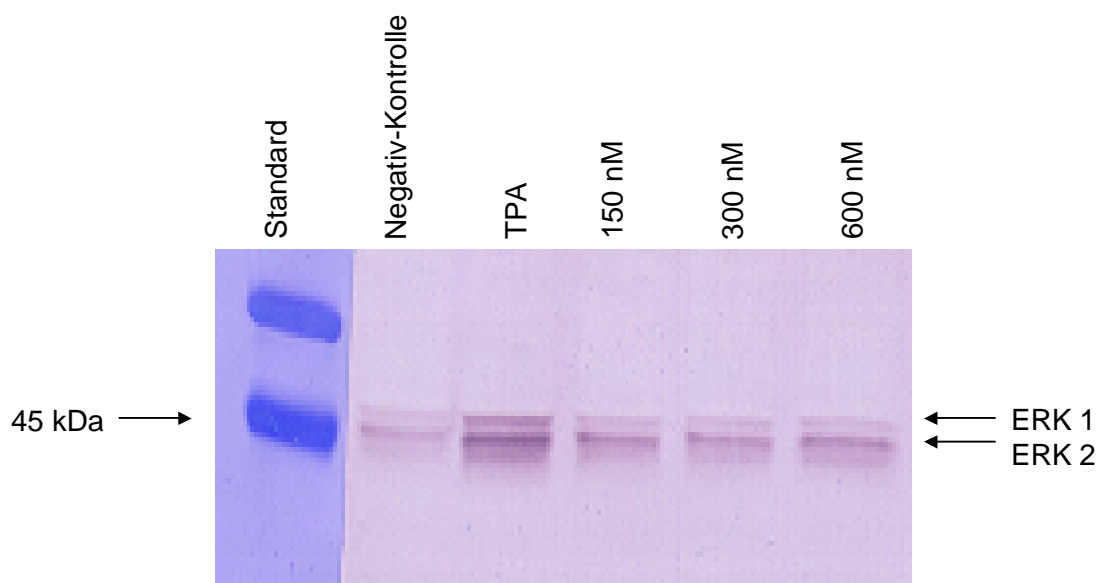
6. Zellpassage. Ein Wiederholungsversuch wurde nicht durchgeführt. Die Dehnung oder Gö 6976 scheint eine ERK1/2-Aktivierung in Gö 6976 vorbehandelten Zellen zu bewirken mit der stärksten Aktivierung bei 500nM, welche bei 1000 nM wieder leicht abnimmt.

Die ERK1/2 sind durch TPA im Vergleich zur 4. Passage (siehe Abb. 5.7) stärker aktivierbar und besitzen weniger Aktivität in der Negativ-Kontrolle.

## 5.5 Versuche mit Gö 6983

### 5.5.1 Stimulierender Effekt von Gö 6983 auf ERK1/2 in nicht gedehnten Zellen

Die Zellen wurden mit 30min mit 100nM TPA oder 1h mit 150nM, 300nM oder 600nM Gö 6983 inkubiert. Die Inkubation mit Gö 6983 erfolgte vor der Dehnung. Nach der Dehnung wurden die Zellen 2min inkubiert.



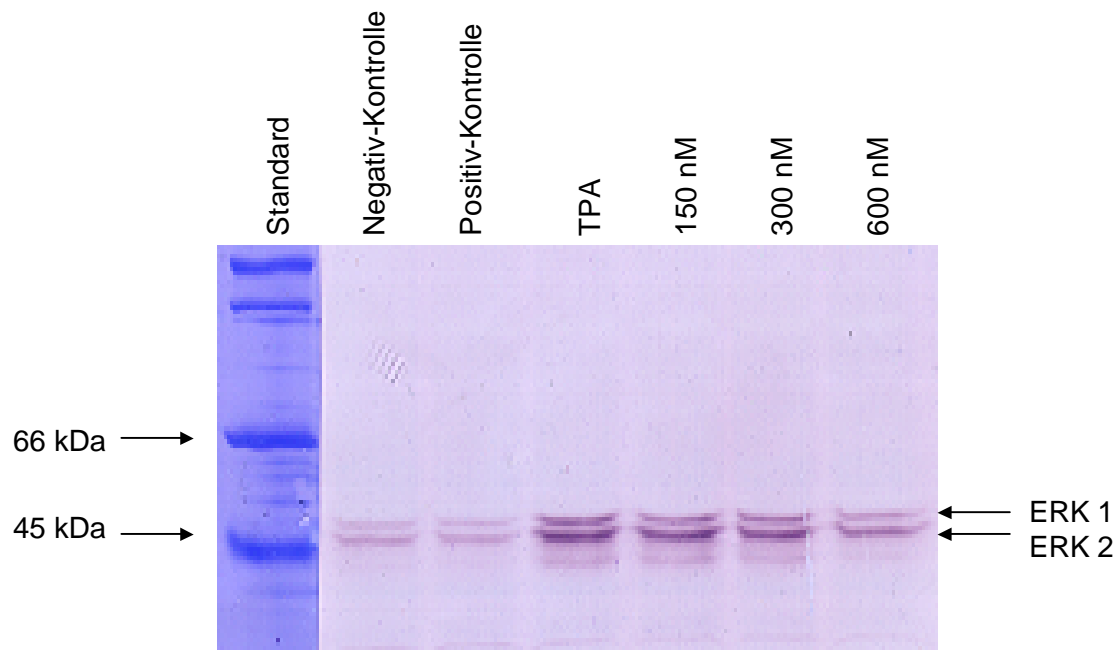
**Abb. 5.9:** 6. Zellpassage. In ungedehnten Zellen hat Gö 6983 einen aktivierenden Effekt auf ERK1/2.

6. Zellpassage. Ein Wiederholungsversuch ist nicht durchgeführt worden.

Gö 6983 bewirkt in ungedehnten Zellen eine Aktivierung von ERK1/2, deren Aktivierung bei steigenden Konzentrationen von Gö 6983 bei 600nM am stärksten ist.

## 5.5.2 Dehnungsversuche mit Gö 6983

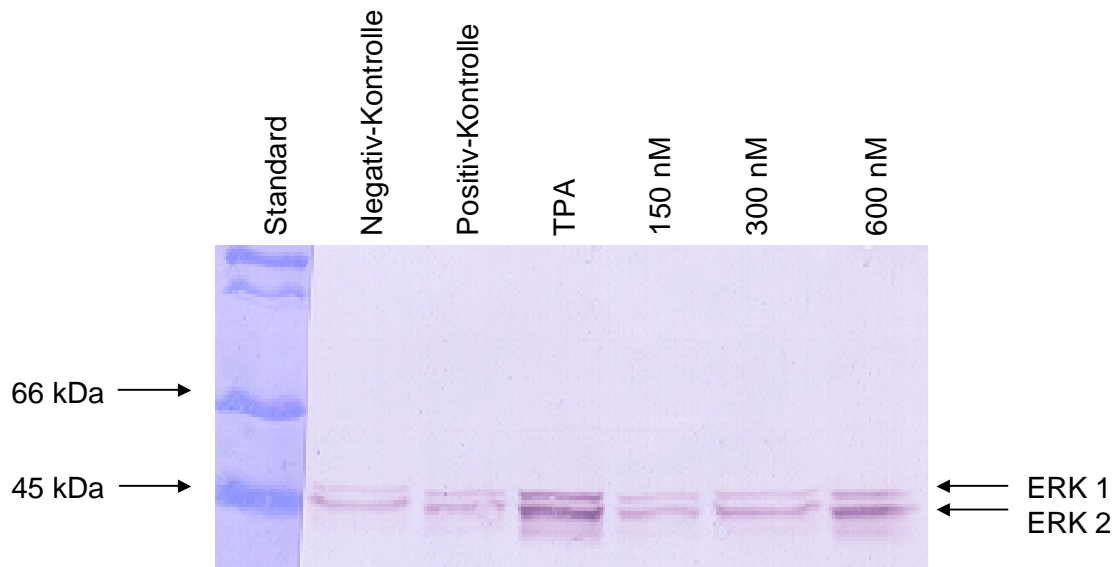
### 5.5.2.1 Dehnung der 6. Zellpassage



**Abb. 5.10:** 6. Zellpassage. Durch Dehnung kommt es zur verminderten ERK1/2-Aktivierung.

6. Zellpassage. Es wurde mit dieser Zellpassage ein Dehnungsversuch durchgeführt. Mit 150nM Gö 6983 kommt es zur Aktivierung der ERK1/2, die durch höhere Konzentrationen mit 300nM und 600nM wieder abnimmt. Zellen, die nur gedehnt wurden, lassen sogar eine gering verminderte Aktivität von ERK1/2 erkennen, wenn man diese mit der Negativ-Kontrolle vergleicht.

### 5.5.2.2 Dehnung der 9. Zellpassage



**Abb. 5.11:** 9. Zellpassage. Entgegengesetzte Wirkung durch Gö 6983 bei Dehnung im Vergleich zur 6. Zellpassage.

9. Zellpassage. Der Versuch wurde ohne Wiederholung durchgeführt. Interessanterweise zeigt die 9. Zellpassage im Gegensatz zur 6. Passage unter Dehnung eine Aktivitätszunahme von ERK1/2 durch Zunahme der Konzentrationen von Gö 6983.

## 5.6 Ergebniszusammenfassung

- Durch den MTT-Zellproliferationsassay konnte die Mechanosensitivität von MG-63-Osteosarkomzellen der 5. Zellpassage nachgewiesen werden. Nach einer mechanischen Stimulierung mit jeweils 4000 $\mu$ str, 30 Zyklen und 1 Hz an zwei aufeinanderfolgenden Tagen stieg die Aktivität der gedehnten Zellen im Vergleich zur ungedehnten Kontrollgruppe um 28,48% an.
- MG-63 Osteosarkomzellen besitzen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Grundaktivität von ERK1/2, wobei die Aktivität von ERK2 stets höher ist als die von ERK1. Dabei können niedrigere und höhere Zellpassagen sowohl eine stärkere als auch geringere ERK1/2-Grundaktivität haben.
- Durch uniaxiale Dehnung mit 4000 $\mu$ str und 30 Zyklen mit 1 Hz auf der 4-Punkt-Dehnungsmaschine kommt es je nach Inkubationszeit nach der Dehnung zu einer Aktivierung oder Herunterregulierung der ERK1/2-Aktivität, wobei die Aktivität von ERK2 stets größer ist als die von ERK1.  
30sec nach erfolgter Dehnung zeigt die 3. Passage eine gesteigerte Aktivität von ERK1/2 mit einem Maximum nach 1min. Zellen der 9. Passage reagieren dagegen nach 30sec mit einer Herunterregulierung von ERK1/2, welche 2min nach Dehnung am geringsten ist. Eine deutlich gesteigerte Aktivität zeigt sich 15min nach Dehnung bei Zellen der 12. Passage.
- BAPTA AM bewirkt eine Aktivierung der ERK1/2 in ungedehnten Zellen der 8. Zellpassage.

- Durch Gö 6976 kommt es bei 100nM zu einer Herunterregulierung und ab 500nM zu einer Aktivierung der ERK1/2 in ungedehnten Zellen, wobei eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige PKC an der Signalkaskade beteiligt zu sein scheint. Die Aktivitätszunahme durch Gö 6976 als Inhibitor ist vermutlich auf eine paradoxe Aktivierung zurückzuführen, durch welche aufgrund der PKC-Hemmung kompensatorisch ein "upstream"-Regulator aktiviert wird.
- Gö 6983 stimuliert ERK1/2 in ungedehnten Zellen der 6. Zellpassage, und auch hier scheint eine paradoxe Aktivierung vorzuliegen. Durch Dehnung kommt es jedoch zur Herunterregulierung der Aktivität.
- Eine höhere Zellpassage (9. Passage) reagiert dagegen durch Hemmung von Gö 6983 unter der Dehnung mit einer Aktivitätszunahme von ERK1/2.

## 6 Diskussion

Die Mechanotransduktion ist zwar schon seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung, dennoch ist bis dato weder der Stimulus wie mechanische Dehnung mit daraus resultierender direkter Deformierung der Zelle oder strömende Potentiale (*streaming potentials*) noch der genaue Weg der intrazellulären Signalweiterleitung bekannt.

Über die verschiedenen Signalkaskaden ist zwar schon einiges bekannt, jedoch aufgrund der möglicherweise stattfindenden Interaktionen zwischen den Signaltransduktionswegen ist der komplexe Sachverhalt noch nicht gänzlich verstanden.

Es konnte mit Hilfe des MTT-Zellproliferationsassay nach Mosmann (Mosmann, 1983) gezeigt werden, dass MG-63 Osteosarkomzellen auf mechanische Deformierung mit einer Zellproliferation reagieren. Die uniaxiale Dehnung mit 4000 $\mu$ str, 30 Zyklen und 1 Hz auf der "4-Punkt-Dehnungsmaschine" an zwei aufeinanderfolgenden Tagen führte zu einer signifikanten Steigerung der Stoffwechseltätigkeit bzw. Proliferation der Zellen um 28,48% im Vergleich zur nichtgedehnten Negativ-Kontrolle. Hiermit war der Beweis für die Mechanosensitivität der MG-63 Osteosarkomzellen erbracht.

Nachdem sowohl durch zyklische Dehnung als auch durch *shear stress* in Endothelzellen und in mechanisch gedehnten Herzmuskelzellen eine Aktivierung von ERK1/2 nachgewiesen werden konnte (Ikeda, 1999), stellte sich nun die Frage, ob es auch bei MG-63 Osteosarkomzellen zu einer gleichartigen Aktivierung durch Dehnung kommt und in wieweit sich durch Zugabe von Inhibitoren, die in die Signalkaskade eingreifen, die ERK1/2-Aktivierung ändert. Endothelzellen reagieren dabei 10min nach einer zyklischen Dehnung mit einer deutlich gesteigerten Proliferationsrate und



Aktivierung von ERK1/2 (Ikeda, 1999). Hung konnte zeigen, dass eine durch Flüssigkeitsbewegungen (*fluid flow*) induzierte Mechanotransduktion eine Aktivierung von ERK1/2 in Chondrozyten hervorruft (Hung, 2002). Zumindest konnte durch laminare Flüssigkeitsbewegung eine Induktion der ERK-Phosphorylierung in MG-63 Osteosarkomzellen mit einem Maximum nach 30min nachgewiesen werden (Weyts, 2002). Eine Aktivierung durch IGF-1 hatte in denselben Zellen eine Stimulierung von ERK1 zur Folge (Zhang, 1999). Mitogene wie bFGF, IGF-1 und PDGF-BB haben auf ERK1/2 in humanen Osteoblasten (HOB) und Osteosarkomzellen (TE85, MG-63, SaOS-2) sowie in Osteoblasten der Ratte (ROS 17/2.8, UMR-106) und Maus (MC3T3-E1) einen stimulierenden Effekt (Chaudhary, 1997).

Mittels Immunoblotverfahren mit Antikörpern gegen aktive ERK1/2 in Osteoblastenzellen von Mensch, Mäusen und Ratten ist im Vergleich zu ERK1 eine stets stärkere Signalintensität von ERK2 zu erkennen. Die stärkere Signalintensität könnte sich dadurch erklären, dass die relative Menge von ERK1 niedriger ist als die von ERK2, ERK1 nicht immer vollständig denaturiert und weniger stabil ist, wobei der Stabilitätsgrad im Gel auch vom Zelltyp abhängig ist. Eine sehr geringe oder nicht nachweisbare Grundaktivität von ERK1 zeigte sich dabei in *in-gel* MAP kinase- und Immunkomplex-Kinasen-Assays. Allerdings hatte ERK2 in MG-63 Zellen eine sehr geringe oder keine Grundaktivität (Chaudhary, 1997). In HOB-, HBMS- und humanen Osteosarkomzellen konnte durch bFGF, IGF-1 und PDGF-BB vornehmlich eine ERK2-Aktivierung nachgewiesen werden, wohingegen ERK1/2 durch Wachstumsfaktoren in osteoblastenähnlichen Zelllinien von Ratten, ROS 17/2.8 und UMR-106 gleichermaßen stimuliert werden und ERK1 in ROS 17/2.8-Zellen eine stärkere Aktivierung zeigt. Somit lässt sich hier erstmals demonstrieren, dass die Aktivierung von MAP-Kinasen in Osteoblasten Unterschiede innerhalb einer Spezies aufweist (Chaudhary, 1998).

Nach uniaxialer Dehnung mit  $4000\mu\text{str}$ , 30 Zyklen und 1 Hz kommt es nach einer Inkubationszeit zwischen 30sec und 15min zu einer Aktivierung oder Herunterregulierung der ERK1/2-Aktivität in MG-63 Osteosarkomzellen.

Durch zyklische Dehnung von Endothelzellen werden ERK1/2 nach 5min aktiviert mit einer maximalen Aktivierung nach 10min, wodurch es zu einem Anstieg von ERK1 um  $50\pm 12\%$  und von ERK2 um  $51\pm 25\%$  kommt (Ikeda, 1999). FDG-2 und PDGF-BB aktivieren nach 10min ERK1/2 in humanen Osteoblasten (HOB) und HBMS-Zellen (normal human bone marrow stromal cells) (Chaudhary, 1998). In BAEC (bovine aortic endothelial cells) werden ERK1/2 durch *shear stress* je nach Größe der Kraft entsprechend aktiviert. Die maximale Aktivierung trat nach 5min auf und ging nach 30min wieder auf die basale Aktivität zurück, wobei sich sogar ein biphasischer Anstieg der Signalintensität zeigte (Jo, 1997). Frühestens 5min nach mechanischer Dehnung antwortet die Zwerchfellmuskulatur mit einer erhöhten Aktivität von ERK1/2, welche Maximalwerte nach 15min annimmt (Kumar, 2002). In Herzmyozyten von Ratten haben Sadoshima und Izumo eine deutliche ERK1/2-Aktivierung mit einem Maximum 10min nach der Dehnung festgestellt (Sadoshima, 1993).

Nach den beschriebenen Ergebnissen gilt es demnach als erwiesen, dass unterschiedliche Stimuli wie mechanische Dehnung, *shear stress*, laminare Flüssigkeitsbewegung, FDG-2 und PDGF-BB eine Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2 bewirken.

Es gibt jedoch in gleichen als auch in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Signalkaskaden, die letztendlich zu einer ERK1/2-Aktivierung führen, wobei je nach hämodynamischer Kraft (*shear stress* oder zyklische Dehnung) im gleichen Zelltyp unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert werden. Zyklische Dehnung stimuliert in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedliche Signalkaskaden. Zudem wird sogar eine zellspezifische Signalkaskade in Astrocyten und Gliomazellen beschrieben (Ikeda, 1999).

Um die bereits im Labor für experimentelle Orthopädie der Universitätsklinik Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Jones erhaltenen Ergebnisse von Osteoblasten unter Mechanotransduktion mit 4000 $\mu$ str, 30 Zyklen und 1 Hz vergleichen zu können, wurden daher in dieser Arbeit MG-63 Osteosarkomzellen gleichermaßen gedehnt und hinsichtlich ihrer ERK1 und 2 Aktivität durch Zugabe von TPA, BAPTA AM und PKC-Inhibitoren (Gö 6976, Gö 6983) in nicht gedehnten und gedehnten Zellen untersucht.

Die zeitliche Latenz der Phosphorylierung von ERK1/2 in Osteoblasten gibt Hinweise darauf, dass es sich hierbei um eine oder mehrere vorgeschaltete Signalkaskaden handelt, welche letztendlich zu einer Aktivierung von ERK1/2 führen.

Um MG-63 Osteosarkomzellen hinsichtlich ihrer Inkubationszeit nach Dehnung mit maximaler ERK1/2-Aktivierung zu untersuchen, wurden die ersten Dehnungsversuche ohne Zugabe von Inhibitoren durchgeführt. Zellen der 3. Passage zeigten dabei eine kaum nachweisbare Grundaktivität von ERK1/2 mit einer maximalen Aktivierung 1min nach der Dehnung. In der Arbeit von Jürgen Leitsch haben primäre Osteoblasten allerdings keine basale Aktivität gezeigt. Interessanterweise hatte jedoch eine höhere Zellpassage (9. Zellpassage) eine starke Grundaktivität von ERK1/2, die durch TPA noch gesteigert werden konnte. TPA ist ein Tumorpromotor, der an die C1-Domäne der PKC bindet und eine geringere Autoinhibition der PKC hervorruft, was zur PKC-Aktivierung führt (Newton, 1995; Toker, 1998). Die durch TPA aktivierten PKCs sind die cPKCs ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ), nPKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) und die PKC $\mu$ , welche MEK1 aktivieren und die Koexpression von c-Raf bewirken, wodurch eine Aktivierung von ERK resultiert (Ueda, 1996). PKC $\zeta$  und  $\lambda$  besitzen einen Glutaminrest mit phosphorylierender Wirkung und besitzen daher eine hohe basale Aktivität. In unstimulierten Zellen sind mindestens 50% der Thr-Reste der cPKC (z.B.  $\beta_2$ ) phosphoryliert (Toker, 1998).

Eine Aktivierung von ERK1/2 durch Dehnung konnte gegen Erwartung nicht nachgewiesen werden, vielmehr kam es zu einer Herunterregulierung, die 30sec nach mechanischer Belastung am stärksten und nach 2min am geringsten war. In den Versuchen (Abb 5.2 und 5.3) konnte gezeigt werden, dass in gedehnten Zellen die stärkste Aktivität von ERK1/2 1min bzw. 2min nach der Dehnung ist, wobei aber in Abb 5.3 die basale Aktivität stets höher ist. Überraschenderweise kam es in einem der letzten Versuche mit Zellen der 12. Passage (Abb 5.4) zu einem anderen Aktivierungsmuster, wonach die Zellen hier die stärkste Aktivierung 15min nach der Dehnung haben.

Physiologische Dehnung von Osteoblasten stimuliert direkt die PLC $\gamma$ -1 (Jones, 1991), wodurch es zur Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> kommt und dabei IP<sub>3</sub> und DAG entstehen. IP<sub>3</sub> erhöht die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und DAG aktiviert die PKC (Essen, 1996), was letztendlich zur ERK1/2-Aktivierung führt. Eine mögliche Ursache für die Herunterregulierung der ERK1/2-Aktivität durch Dehnung könnte ein durch Mutation gestörter Autoinhibitionsmechanismus sein. Eine verminderte Autoinhibition und damit eine Aktivierung der PKC entsteht dann, wenn DAG und TPA an die C1-Domäne binden (Toker, 1998). Es könnte aber auch eine Änderung der Threonin "Schlüssel"-Reste, die wahrscheinlich der Hauptort der Phosphorylierung sind, eine Aktivierung der PKC verhindern bzw. eine verminderte Aktivität bewirken.

Da sich in diesen 3 Versuchen mit alleiniger Dehnung jeweils ein unterschiedliches Aktivierungsmuster von ERK1/2 gezeigt hat, wonach die Grundaktivität sowohl niedriger als auch höher sein kann als die in gedehnten Zellen, wird die Interpretation der folgenden Ergebnisse erschwert.

Durch eine Ca<sup>2+</sup>-Komplexbildung mit BAPTA AM hat sich in nicht gedehnten Zellen eine ERK1/2-Aktivierung gezeigt, während eher eine verminderte Aktivität zu erwarten gewesen wäre, da durch die Komplexbildung weniger

intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  vorliegt. Man könnte hier auch von einer sogenannten paradoxen Aktivierung sprechen. Eine paradoxe Aktivierung konnte in humanen HL60 Leukämiezellen mit Hilfe des p38MAP-Kinase-Inhibitors SB203580 nachgewiesen werden, da es unter Hemmung der p38MAP-Kinase zu einer Aktivierung von JNK und ERK kam. Es wird daher angenommen, dass durch Hemmung der p38MAP-Kinasen-Aktivität kompensatorisch ein *upstream*-Regulator stressaktivierter Kaskaden aktiviert wird. MLK3 (mixed lineage kinase) hat die Eigenschaft, die der eines solchen Regulators nahe kommt, aktiviert JNK, p38MAPK und ERK und kann so eine Verbindung zwischen diesen Kaskaden herstellen (Wang, 2000).

Die gedehnten Zellen haben mit einer BAPTA AM-Vorbehandlung eine ähnliche ERK1/2-Aktivierung, wobei allerdings keine genaue Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Stimulierung allein auf die Dehnung oder BAPTA AM zurückzuführen ist. Vergleicht man das Ergebnis mit und ohne Dehnung, so liegt die Vermutung nahe, dass eine zusätzliche mechanische Belastung ab 50  $\mu\text{M}$  BAPTA AM eine Herunterregulierung der Aktivität von ERK1/2 zur Folge hat.

Ein ähnliches Ergebnis konnte mit Gö 6976 in nicht gedehnten Zellen erzielt werden, wo auch hier sich eine Aktivitätszunahme ab 500nM zeigen ließ. Allerdings bei 100nM werden die aktive ERK1/2 herunterreguliert. Bei hier dargestellter hoher basaler Aktivität von ERK1/2 der 4. Zellpassage inhibiert Gö 6976 wohl eher die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige PKC, da nur Konzentrationen bis 1000nM verwendet wurden (s.3.6.3.). Höhere Konzentrationen von Gö 6976 lassen die Aktivität von ERK1/2 steigen und haben somit einen gegenteiligen Effekt. Auch hier wiederum könnte die gegenteilige Wirkung von Gö 6976 auf ERK1/2 auf eine paradoxe Aktivierung zurückzuführen sein, indem wie schon erwähnt ein *upstream*-Regulator stressaktivierter Kaskaden aktiviert wird. Eine paradoxe Aktivierung wurde auch durch Inhibition von c-Raf mit SB203580 beobachtet, die möglicherweise dann

entsteht, wenn der negative Feedback-Mechanismus von c-Raf unterdrückt wird oder Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und c-Raf auftreten, welche eine Oligomerisierung von c-Raf nach sich zieht oder c-Raf einfach zur Plasmamembran gelangt. c-Raf selbst unterdrückt seine Aktivität durch Feedback, genauer gesagt durch einen negativen Feedback-Mechanismus, durch welchen die Aktivität durch die eigene unterdrückt wird. Das Durchbrechen der negativen Feedback-Schleife durch Inhibitoren führt dann zu einem Anstieg der aktiven Form, wobei im Falle einer Hemmung von c-Raf mit SB203580 eine Aktivierung von MEK und ERK erfolgt. Numazawa fand diese Art paradoxer Aktivierung in humanen monozytären THP-1 Zellen, nachdem sie mit SB203580 behandelt wurden, da sie mit einer gesteigerten Aktivität von c-Raf reagiert haben und es schließlich zu einer Aktivierung von MEK1 und ERK gekommen ist (Hall-Jackson, 1999), (Numazawa, 2003). Eine durch Gö 6976 inhibierte PKC könnte somit ihre selbst unterdrückte Aktivität wieder aufnehmen oder eine Aktivierung eines *upstream*-Regulators bewirken. Mit Gö 6976 inhibierte Zellen zeigen durch eine zusätzliche Dehnung eine vermeintliche Änderung ihrer ERK1/2-Aktivierbarkeit, da es bei 100nM Gö 6976 zu einer Aktivierung und nicht Herunterregulierung kommt. Die stärkste Aktivierung ist bei 500nM Gö 6976. Vorausgesetzt beide Zellenpassagen (4. und 6. Passage) reagieren auf Dehnung in Bezug auf die ERK1/2-Aktivität in gleicher Weise, so scheint die Dehnung in Abhängigkeit der Konzentration von Gö 6976 eine mehr oder weniger starke Aktivität von ERK1/2 zu bewirken.

Gö 6983 hat wie Gö 6976 eine stimulierende Wirkung auf ERK1/2 in ungedehnten Zellen, zeigt aber hier keine Abnahme der ERK-Aktivität und scheint eine paradoxe Aktivierung zu bewirken. Die gleiche Passage (6. Passage) reagiert durch Dehnung mit einer Aktivitätsabnahme von ERK1/2, wobei allerdings die Positiv-Kontrolle (nur gedehnte Zellen) in Abb 5.10. fraglich auf die Dehnung reagiert. Da aber genau die gleiche Zellpassage für die Versuche verwendet wurde und sich in den nichtgedehnten Zellen eine

Aktivierung von ERK1/2 durch Gö 6983 zeigt, kann sehr wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass die Aktivitätsabnahme von ERK1/2 durch mechanische Belastung verursacht wird. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Dehnung als eigentlicher aktivierender Stimulus der paradoxen Aktivierung, die durch Inhibition eines am Signaltransduktionsweg beteiligten Substrats entsteht, entgegenwirkt bzw. einen gegenteiligen Effekt hat. Gedehte Zellen der 9. Passage liefern dagegen ein unerwartetes Ergebnis, da es unter Zugabe von Gö 6983 und Dehnung eine Aktivitätszunahme von ERK1/2 zeigt. Hierbei lässt die Interpretation nur Spekulationen zu, da zum Vergleich kein Versuch mit ungedehnten Zellen der 9. Passage durchgeführt wurde. Unter Berücksichtigung der Positiv-Kontrolle (gedehnte Zellen) hat hier die Dehnung möglicherweise keinen Einfluß mehr auf die ERK1/2-Aktivierung. Vielleicht sind die Zellen kaum noch mechanosensitiv aber reagieren noch auf Gö 6983 mit paradoxer Aktivierung.

Es sollte bei den Interpretationen wohl aber auch der Aspekt der PKC-Autophosphorylierung berücksichtigt werden, welche die physiologische Aufgabe haben könnte, die Enzymaktivität zu ändern, um die Substratkonzentration begrenzt zu halten. Eine Autophosphorylierung könnte durch eine Intraeptidreaktion zustande kommen, was vielleicht eine Herunterregulierung der aktiven PKC zu Folge hat (Newton, 1987). Das könnte möglicherweise auch die unterschiedliche basale Aktivität von ERK1/2 erklären.

Jürgen Leitsch konnte in seiner Arbeit zeigen, dass durch Hemmung der MAPKKinase (MEK) mit dem MEK-Inhibitor PD98059 nach Dehnung primärer Osteoblasten eine Aktivierung der ERK1/2 ausbleibt. Ebenso erbrachte Hung den Beweis, dass es durch denselben MEK-Inhibitor in mechanisch belasteten Chondrozyten zu keiner ERK-Aktivierung kommt (Hung, 2000). Bovine aortale Endothelzellen wurden zyklisch mit 0,1str gedehnt und durch Behandlung der Zellen mit dem o.g. MEK-Inhibitor

konnte die ERK1/2-Aktivierung verhindert werden, allerdings blieb die Zellproliferation unbeeinflusst (Ikeda, 1999). Mit antisense PKC-Oligonukleotiden versehene Endothelzellen wurden von Traub et al. hinsichtlich ihrer ERK-Aktivierung untersucht. Durch antisense PKC $\epsilon$ -Oligonukleotide wurde die *shear stress* induzierte Aktivierung von ERK1/2 unterbunden, hingegen hatten antisense PKC $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\xi$ -Oligonukleotide keinen Effekt auf die ERK1/2-Grundaktivität, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass die PKC $\epsilon$  für die Aktivierung von ERK1/2 verantwortlich ist (Traub, 1997). In der Arbeit von Bernd Bromme kam der SERCA-Inhibitor Thapsigargin zu Anwendung, der die Ca<sup>2+</sup>-ATPase im endoplasmatischen Reticulum hemmt. In seinen Experimenten hat sich gezeigt, dass es in Osteoblasten trotz fehlender Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu einer Aktivierung von ERK1/2 durch mechanische Belastung kommt. Intrazelluläres Calcium hat also keinen Einfluß auf die ERK1/2-Aktivierung (Bromme und Jones, 2000). Berk vermutet Ca<sup>2+</sup>-abhängige und -unabhängige Signalkaskaden in Endothelzellen, welche beide durch Mechanotransduktion stimuliert werden, wobei die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalkaskade schnell und kurze Zeit reagiert und neben einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine aktivierende Wirkung auf die Phospholipase C und Ca<sup>2+</sup>-abhängige PKC hat. Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PKC und MAPKinasen werden durch die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Signalkaskade stimuliert, dessen Aktivierung langsam und länger dauert. Berk ist daher der Meinung, dass an der Zellantwort auf *fluid shear stress* in Endothelzellen Ca<sup>2+</sup>-abhängige und -unabhängige Signalkaskaden beteiligt sind, die dynamisch miteinander verknüpft sind (Berk, 1995).

Mehrere Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass durch Dehnung intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> Kalium-Kanäle in Osteoblasten aktiviert, eine Zellhyperpolarisation resultiert und Ca<sup>2+</sup> in die Zelle strömt (Jones, 1995). Da sich jedoch in der Arbeit von Bernd Bromme eine Ca<sup>2+</sup>-unabhängige ERK1/2-Aktivierung von Osteoblasten durch o.g. Experimente gezeigt hat,



stellt sich nun die Frage, welche Funktion intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  hat, da es scheinbar nicht direkt an der Aktivierung von ERK1/2 beteiligt ist.

In Zusammenschau der vielen Experimente ist wahrscheinlich davon auszugehen, dass nicht nur eine Signalkaskade ursächlich für die Zellantwort mechanosensibler Zellen ist. Vielmehr ist es ein Zusammenspiel verschiedener Signalkaskaden. Daher die Vermutung von Berk, es handele sich in der Signalverarbeitung *fluid shear stress* stimulierter Endothelzellen um ein Zusammenwirken  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger und -unabhängiger Kaskaden. Zumindest könnte das Ergebnis der Abb 5.4 die Theorie unterstützen, da es erst nach 15min zu einer starken ERK1/2-Aktivierung kommt. Womöglich wird durch Dehnung aufgrund einer Mutation der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Signaltransduktionsweg in älteren MG-63 Osteosarkomzellen (12. Passage) bevorzugt stimuliert, in jüngeren Zellen hingegen eher die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalkaskade.

Es bleibt dennoch schwierig, die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen zu vergleichen, da im Rahmen der Mechanotransduktion je nach Zelltyp jeweils unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden. In der gleichen Zelle wird (werden) sogar je nach Stimulus die entsprechende(n) Kaskade(n) stimuliert (Ikeda, 1999). Insbesondere Tumorzellen könnten Schwierigkeiten hinsichtlich der Interpretation der Versuchsergebnisse aufweisen, da es womöglich zu neu auftretenden Mutationen kommen kann, welche die Signalweiterleitung beeinflussen oder durch welche die Zelle entsprechend der Mutation auf den Reiz andersartig reagiert.

Was aber auch nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die Aussage Duncans, die besagt, dass die Wirkung mechanischer Belastung abhängig ist vom Ausmaß, der Dauer und Häufigkeit der Belastung. Zudem muß diese zyklisch sein, um neue Knochenbildung bewirken zu können. Dahergehend

wäre es zumindest möglich, dass eine von Hand betriebene nicht homogene zyklische Dehnung andere Auswirkungen auf die ERK1/2-Aktivierung haben könnte als eine maschinell erfolgte Dehnung.

Um also besser vergleichbare Ergebnisse mit 4000 $\mu$ str, 30 Zyklen und 1 Hz gedehnte MG-63 Osteosarkomzellen erzielen zu können, sollte jede Tumorzellpassage für sich untersucht werden. Zunächst müssen die Inkubationszeiten mit stärkster ERK1/2-Aktivierung/Aktivität nach erfolgter Dehnung von der jeweiligen Zellpassage bestimmt werden und die Zellen dann jeweils im nicht gedehnten und gedehnten Zustand auf ihre ERK1/2-Aktivität unter Zugabe von Aktivatoren (TPA) und Inhibitoren (BAPTA AM, Gö 6976, Gö 6983) hin untersucht werden, am besten mit jeweils maschinell durchgeführter oder von Hand betriebener zyklischer Dehnung. Interessant wird es dann, wenn noch andere Aktivatoren und Inhibitoren Anwendung finden.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde experimentell untersucht, welchen Einfluß TPA und Inhibitoren auf die ERK1/2-Aktivierung in ungedehnten MG-63 Osteosarkomzellen haben und in wieweit eine zusätzliche Dehnung eine Aktivierungsänderung hervorruft.

Um MG-63 Osteosarkomzellen hinsichtlich ihrer Mechanosensitivität zu überprüfen, wurde der MTT-Zellproliferationsassay mit Zellen der 5. Passage durchgeführt, durch welchen eine Stoffwechselsteigerung um 28,48% nach mechanischer Belastung gezeigt werden konnte.

Durch Dehnung mit 4000 $\mu$ str, 30 Zyklen und 1 Hz zeigt sich bei Zellen der 3. Passage eine maximale Aktivitätssteigerung von ERK1/2 nach 1min, dagegen bei der 12. Passage eine starke Aktivitätszunahme erst nach 15min. 30sec nach Dehnung von Zellen der 9. Passage wird die ERK1/2-Aktivität herunterreguliert, steigt nach 2min wieder am stärksten an, wobei jedoch die basale Aktivität stets größer ist als die durch Dehnung veränderte Aktivität.

Inhibitoren, die in die Signalkaskade eingreifen wie BAPTA AM, Gö 6976 und Gö 6983 bewirken in ungedehnten Zellen eine ERK1/2-Aktivierung. Dabei könnte die paradoxe Aktivierung eine Erklärung dafür sein, indem durch Hemmung der PKC kompensatorisch ein *upstream*-Regulator aktiviert oder infolge Durchbrechen des negativen Feedback-Mechanismus die PKC-Autoinhibition unterdrückt wird, was zur Aktivierung der PKC führt.

Letztendlich ist unter Berücksichtigung der bisher durchgeführten Experimente der verschiedenen Arbeitsgruppen der genaue zur ERK1/2-Aktivierung führende Signaltransduktionsweg noch ungeklärt. Vermutlich

sind aber an der Signalverarbeitung mehrere Signalkaskaden beteiligt, sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Signalkaskaden.

Da sich in Abhängigkeit von der Tumorzellpassage eine unterschiedliche Stärke der Aktivität und Aktivierung von ERK1/2 zeigte, sollte für jede einzelne Tumorzellpassage eine Versuchsreihe wie folgt durchgeführt werden:

- Bestimmung der Inkubationszeit mit maximaler Aktivierung von ERK1/2
- Versuche mit den genannten Inhibitoren mit und ohne Dehnung.

## 8 Literatur

BARINAGA MARCIA (1995) Two Major Signaling Pathways Meet at MAP-Kinase. *Science* **269**, 1673.

BELLIDO TERESITA, BORBA VICTORIA Z. C., ROBERSON, and MANOLAGAS (1997) Activation of the Janus Kinase/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) Signal Transduction Pathway by Interleukin-6-Type Cytokines Promotes Osteoblast Differentiation. *Journal of Endocrinology* **138**, 3666-3676.

BERK BRADFORD C., CORSON MARSHALL A., PETERSON, and TSENG (1995) Protein Kinases as Mediators of Fluid Shear Stress Stimulated Signal Transduction in Endothelial Cells: A Hypothesis for Calcium-dependent and Calcium-independent Events Activated by Flow. *Biomechanics* **28**, 1439-1450.

BILLIAU A., EDY V. G., HEREMANS, DAMME, DESMYTER, GEORGIADES, and DE SOMER (1977) Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **12** (1), 11-15.

BOGUSKI MARK S. and McCORMICK FRANK (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654.

BOULTON TERI G. and COBB MELANIE H. (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation* **2**, 357-371.

BRADFORD M. MARION (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

BRIGHTON CARL T. et al. (1991) The Proliferative and Synthetic Response of Isolated Calvarial Bone Cells of Rats to Cyclic Biaxial Mechanical Strain. *Journal of Bone and Joint Surgery* 320-331.

CHAUDHARY LALA R. and AVIOLI LOUIS V. (1997) Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 (ERK1 and 2) by FGF-2 and PDGF-BB in Normal Human Osteoblastic and Bone Marrow Stromal Cells: Differences in Mobility and In-Gel Renaturation of ERK1 in Human, Rat, and Mouse Osteoblastic Cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications* **238**, 134-139.

CHAUDHARY LALA R. and AVIOLI LOUIS V. (1998) Identification and activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: Attenuation of MAP kinase

activation by camp, parathyroid hormone and forskolin. *Journal of Molecular and Cellular Biochemistry* **178**, 59-68.

CHEN NANYUE, MA WEI-YA, SHE, WU, LIU, BODE, and DONG (2001) Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Is Involved in 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Signal Transduction. *J. of Biological Chemistry* **276** (50), 46722-46728.

CHEN YAN, WU QIAO, SONG, and SU (2002) Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* **8** (6), 1014-1018.

COMPTON STEVE J. and JONES CLIVE G. (1985) Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay. *Analytical Biochemistry* **151**, 369-374.

CROW TERRY, XUE-BIAN JUAN-JUAN, SIDDIQI VILMA and NEARY JOSEPH T. (2001) Serotonin activation of the ERK pathway in Hermisenda: contribution of calcium-dependent protein kinase C. *Journal of Neurochemistry* **78**, 358-364.

CUSSAC DIDIER, NEWMANN-TANCREDI ADRIAN, PASTEAU VALERIE and MILLAN MARK J. (1999) Human Dopamine D<sub>3</sub> Receptors Mediate Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Via a Phosphatidylinositol 3-Kinase and an Atypical Protein Kinase C-Dependent Mechanism. *Molecular Pharmacology* **56**, 1025-1030.

DAUM GÜNTER, EISENMANN-TAPPE IRIS, FRIES HANS-WERNER, TROPPEMAIR JAKOB, and RAPP ULF R. (1994) The ins and outs of RAF kinases. *TIBS* **19**, 474-480.

DARNELL JR. JAMES E., KERR IAN M., and STARK GEORGE R. (1994) Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* **264**, 1415-1421.

DAVID MICHAEL, PETRICIOIN III EMANUEL, BENJAMIN CHRISTOPHER, PINE RICHARD, WEBER MICHAEL J., and LARNER ANDREW C. (1995) Requirement for MAP Kinase (ERK2) Activity in Interferon  $\alpha$ - and Interferon  $\beta$ -Stimulated Gene Expression Through STAT Proteins. *Science* **269**, 1721-1723.

DUNBAR and BONNIE S. (1994) Protein Blotting, a practical approach. *The practical approach series, IRL Press at Oxford University Press*. 6-193.

DUNCAN R. L. and TURNER C. H. (1995) Mechanotransduction and the Functional Response of Bone Mechanical Strain. *Calcified Tissue International* **57**, 344-358.

- ECKERT W. A. und KARTENBECK J. (1996) Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion. *Springer Verlag, Labormanual*.
- EL HAJ A. J. and THOMAS G. P. (1994) Cellular modelling of mechanical interactions with the skeleton. *Society for Experimental Biology Seminar Series 54: Biomechanics and Cells*, ed. F. Lyall & A. J. El Haj. Cambridge University press, pp. 147-163.
- ENDO HIDEKI et al. (1997) Rapid activation of MAP Kinase by Estrogen in the Bone Cell Line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235**, 99-102.
- FINBLOOM DAVID S. and LARNER ANDRWE C. (1995) Topical Review. Regulation of the JAK/STAT Signaling Pathway. *Cellular Signaling* **7 (8)**, 739-745.
- GSCHWENDT M., HORN F., KITTSTEIN W., FÜRSTENBERGER G. and MARKS F. (1983) Soluble phorbol ester binding sites and phospholipid- and calcium-dependent protein kinase activity in cytosol of chick oviduct. *FEBS* **162 (1)**, 147-150.
- GSCHWENDT MICHAEL et al. (1996) Inhibition of protein kinase C  $\mu$  by various inhibitors. Differentiation from protein kinase C isoenzymes. *FEBS Letters* **392**, 77-80.
- HALL-JACKSON CLARE A, GOEDERT MICHAEL, HEDGE PHILIP and COHEN PHILIP (1999) Effect of SB 203580 on the activity of c-Raf in vitro and in vivo. *Oncogene* **18**, 2047-2054.
- HALL-JACKSON CLARE A et al. (1999) Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor. *Chemistry & Biology* **6**, 559-568.
- Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (2000) Chelators, Calibration Buffers and Cell-Loading Reagents. *Firma Mo Bi Tec GmbH in Göttingen von Molecular Probes Europe Kapitel 20.8*.
- HEFTI MARTIN A, HARDER BEATRICE A., EPPENBERGER HANS M. and SCHAUB MARCUS C. (1997) Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Hypertrophy. *Journal of Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 2873-2892.
- HIPPENSTIEL STEFAN et al. (1998) Rho Protein Inhibition Blocks Protein Kinase C Translocation and Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 830-834.
- HIPSKIND ROBERT A. and BILBE GRAEME (1998) MAP Kinase Signaling Cascades and Gene Expression in Osteoblasts. *Frontiers in Bioscience* **3**, 804-816.

- HUNAG KUO-PING et al. (1986) Autophosphorylation of Rat Brain  $\text{Ca}^{2+}$  - activated and phospholipid-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological chemistry* **261** (26), 12134-12140.
- HUNG CLARK T. et al. (2000) Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization. *Journal of Biomechanics* **33**, 73-80.
- IKEDA MASATAKA, KITO HIROYUKI, and SUMPIO BAUER E. (1999) Phosphatidylinositol-3 Kinase Dependent MAP Kinase Activation via p21ras in Endothelial Cells Exposed to Cyclic Strain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **257**, 668-671.
- IKEDA MASATAKA, TAKEI TEIJI, MILLS IRA, KITO HIROYUKI, and SUMPIO BAUER E. (1999) Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation in endothelial cells exposed to cyclic strain. *American Journal of Physiology (Heart and Circulatory Physiology)* **276**, H614-H622.
- ISHII YUKI, SAKAI SHINGO, and HONMA YOSHIO (2001) Pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 activates p44/42 mitogen-activated protein kinase and induces the differentiation of human myeloid leukemia cells. *Leukemia Research* **25**, 813-820.
- JO HANJOONG et al. (1997) Differential Effect of Shear Stress on Extracellular Signal-regulated Kinase and N-terminal Jun Kinase in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **272** (2), 1395-1401.
- JONES D. B. and SCHOLUEBBERS J.-G. (1988) Mechanical Stress Transduction in OB-like Cells. *Fortschritte der Osteologie in Diagnostik und Therapie. F.H.W. Heuck E. Keck (Hrsg.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg*. 382-389.
- JONES D. B., NOLTE H., SCHOLÜBBERS J.-G., TURNER E. and VELTEL D. (1991) Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* **12**, 101-110.
- JONES David B. and BINGMANN DIETER (1991) How Do Osteoblasts Respond to Mechanical Stimulation? *Cells and Materials* **1** (4), 329-340.
- JONES D. B., LEIVSETH G., SAWADA Y., VAN DER SLOTEN J. and BINGMANN D. (1994) Application of homogenous, defined strain to cell cultures. *Society for Experimental Biology Seminar Series 54: Biomechanics and Cells*, ed. F. Lyall & A. J. El Haj. Cambridge University press, pp. 197-219.
- JONES DAVID, LEIVSETH GUNNAR, and TENBOSCH JOCHEN (1995) Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 525-534.



JUNQUEIRA, CARNEIRO. *Histologie*, T. H. Schiebler, **4. Auflage**, Springer-Verlag. 119-127.

KAJIYA HIROSHI, OKABE KOJI, OKAMOTO FUJIO, TSUZUKI TAKASHI, and SOEDA HIROYUKI (2000) Protein Tyrosine Kinase Inhibitors Increase Cytosolic Calcium and Inhibit Actin Organization as Resorbing Activity in Rat Osteoclasts. *Journal of Cellular Physiology* **183**, 83-90.

KAWATA AKIRA and MIKUNI-TAKAGAKI YUKO (1998) Mechanotransduction in Stretched Osteocytes-Temporal Expression of Immediate Early and Other Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **246**, 404-408.

KOLCH et al. (1993) Protein kinase C $\alpha$  activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**, 249-252.

KRAUSS G. (1997) Biochemie der Regulation und Signaltransduktion.

KUMAR ASHOK, CHAUDHRY IMRAN, REID MICHAEL B., and BORIEK ALADIN M. (2003) Distinct Signaling Pathways Are Activated in Response to Mechanical Stress Applied Axially and Transversely to Skeletal Muscle Fibers. *Journal of Biological Chemistry* **277 (48)**, 46493-46503.

KLEIN-NULEND J. et al. (1998) Nitric Oxide Response to Shear Stress by Human Bone Cell Cultures Is Endothelial Nitric Oxide Synthase Dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **250**, 108-114.

KLEINSCHROTH J., HARTENSTEIN J., RUDOLPH C., C. SCHÄCHTELE (1995) Novel Indolocarbazole Protein Kinase C Inhibitors with Improved Biochemical and Physicochemical Properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **5 (1)**, 55-60.

LEEVERS SALLY J., PATERSON HUGH F., and MARSHALL CHRISTOPHER J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411-414.

LISCOVITCH MORDECHAI and CANTLEY LEWIS C. (1994) Lipid Second Messengers. Meeting Review. *Cell* **77**, 329-334.

MARTINY-BARON GEORG et al. (1993) Communication. Selective Inhibition of Protein Kinase C Isoenzymes by the Indolocarbazole Gö 6976. *Journal of Biological Chemistry* **268 (13)**, 9194-9197.

MCCABE LAURA R., KOCKX MAAIKE, LIAN JANE, STEIN JANET, and STEIN GARY (1995) Selective Expression of fos- and jun-Related Genes

during Osteoblast Proliferation and Differentiation. *Experimental Cell Research* **218**, 255-262.

MIWA MASAICHI, KOZAWA OSAMU, TOKUDA HARUHIKO, and UEMATSU TOSHIHIKO (1999) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases Are Involved in Interleukin-1 (IL-1)-Induced IL-6 Synthesis in Osteoblasts: Modulation Not of p38 MAP Kinase, But of p42/44 MAP Kinase by IL-1-Activated Protein Kinase C. *Journal of Endocrinology* **140** (11), 5120-5125.

MOCHLY-ROSEN DARIA and KOSHLAND DANIEL E., Jr. (1987) Domain Structure and Phosphorylation of Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **262** (5), 2291-2297.

MORTON SIMON, DAVIS ROGER J., McLAREN ANN and COHEN PHILIP (2003) A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO Journal* **22** (15), 3876-3886.

MOSMANN TIM (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63.

NAIDU PADMA S. et al. (1999) Calcium-calmodulin mediates bradykinin-induced MAPK phosphorylation and c-fos induction in vascular cells. *American Journal of Physiology* **277** (Heart Circulatory Physiology **46**) H1061-H1068.

NEWTON ALEXANDRA C. and KOSHLAND DANIEL E. Jr. (1987) Protein Kinase C Autophosphorylates by an Intrapeptide Reaction. *Journal of Biological Chemistry* **262** (21), 10185-10188.

NEWTON ALEXANDRA C. (1995) Minireview. Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry* **270** (48), 28495-28498.

NICHOLL DESMOND S. T. (2002) Gentechnische Methoden. *Spektrum. Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin* **2. Auflage**.

NUMAZAWA SATOSHI et al. (2003) Regulation of ERK-Mediated Signal Transduction by p38 MAP Kinase in Human Monocytic THP-1 Cells. *Journal of Biochemistry* **133**, 599-605.

READ S. M. and NORTHCOTE D. H. (1981) Minimization of Variation in the Response to Different Proteins of the Coomassie Blue G Dye-Binding Assay for Protein. *Analytical Biochemistry* **116**, 53-64.

REBECCHI MARIO J. and PENTYALA SRINIVAS N. (2000) Structure, Function, and Control of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Physiological Reviews* **80** (4), 1291-1335.

- SADOSHIMA JUN-ICHI and IZUMO SEIGO (1993) Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO Journal* **12** (4), 1681-1692.
- SCHMIDT CHRISTIAN, POMMERENKE HAGEN, DÜRR FRIEDA, NEBE BARBARA, and RYCHLY JOACHIM (1998) Mechanical Stressing of Integrin Receptors Induces Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Cytoskeletally Anchored Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **273** (9), 5081-5085.
- SCHRIMPF GANGOLF mit Beiträgen von Aigner Achim (2002) Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. *Spektrum. Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin* **3. Auflage**.
- SLATER SIMON J., KELLY MARY BETH, TADDEO FRANK J., RUBIN EMANUEL, and STUBBS CHRISTOPHER D. (1994) Evidence for Discrete Diacylglycerol and Phorbol Ester Activator Sites on Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **269** (25), 17160-17165.
- SOBOTTA, WELSCH. (1991) Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. *Lehrbuch der Histologie. Verlag Urban & Fischer*. 191-214.
- SUMPIO B. E. et al. (1994) Mechanical coupling pathways. *Society for Experimental Biology Seminar Series 54: Biomechanics and Cells*, ed. F. Lyall & A. J. El Haj. Cambridge University press, pp. 6-22.
- TOKER ALEX (1998) Signaling Through Protein Kinase C. *Frontiers in Bioscience* **3**, 1134-1147.
- TOWBIN HARRY, STAHELIN THEOPHIL, and GORDON JULIAN (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (9), 4350-4354.
- TRAUB OREN, MONIA BRETT P., DEAN NICHOLAS M., BERK BRADFORD C., (1997) PKC- $\epsilon$  Is Required for Mechano-sensitive Activation of ERK1/2 in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **272** (50), 31251-31257.
- TURNER C. H., OWAN I., ALVEY T., HULMAN J., and HOCK J. M. (1998) Recruitment and Proliferative Responses of Osteoblasts After Mechanical Loading In vivo Determined Using Sustained-Release Bromodeoxyuridine. *Bone* **22** (5), 463-469.
- UEDA YOSHIHIKO et al. (1996) Protein Kinase C  $\delta$  Activates the MEK-ERK Pathway in a Manner Independent of Ras and Dependent on Raf. *The*

*American Society for Biochemistry and Molecular Biology* **271 (38)**, 23512-23519.

WANG XUENING, RAO JIE, and STUDZINSKI GEORGE P. (2000) Inhibition of p38 MAP Kinase Activity Up-Regulates Multiple MAP Kinase Pathways and Potentiates 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Induced Differentiation of Human Leukemia HL60 Cells. *Experimental Cell research* **258**, 425-437.

WENZEL-SEIFERT KATHARINA, SCHÄCHTELE CHRISTOPH and SEIFERT ROLAND (1994) N-Protein Kinase C Isoenzymes may be involved in the Regulation of various neutrophil Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **200 (3)**, 1536-1543.

WEYTS F. A. A. et al. (2002) ERK Activation and  $\alpha v \beta 3$  Integrin Signaling Through Shc Recruitment in Response to Mechanical Stimulation in Human Osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* **87**, 85-92.

YAMAMOTO TAKAHARU, TAYA SHINICHIRO, and KAIBUCHI KOZO (1999) Ras-Induced Transformation and Signaling Pathway. Review. *Journal of Biochemistry* **126**, 799-803.

ZHANG WENYU, LEE JOHN C., KUMAR SANJAY, and GOWEN MAXINE (1999) ERK Pathway Mediates the Activation of Cdk2 in IGF-1-Induced Proliferation of Human Osteosarcoma MG-63 Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* **14 (4)**, 528-535.

ZHANG XIAOKUI et al. (1995) Requirement of Serine Phosphorylation for Formation of STAT-Promoter Complexes. *Science* **267**, 1990-1993.

## 9 Anhang

### Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Baum, Berger, Daut, Friederich, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Haberich, Happle, Havemann, Heß, Hildebrandt, Hilgermann, Huffmann, Jacob, Jones, Joseph, Karlson, Kern, Kleine, Klose, Knoll, Kohlmann, Kretschmer, Kroll, Kummer, Lang, Lange, Lennartz, Maisch, Mannheim, Mennel, Moll, Müller, Netter, Neurath, Reichardt, Rothmund, Röhm, Schäfer, Schachtschabel, Schwarz, Seifart, Slenczka, Stempel, Sturm, Thomas, Voigt, Weihe, Westermann.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jones für das Thema meiner Arbeit und die freie Gestaltung.

Bedanken möchte ich mich auch bei den MTAs Frau Marita Kratz und Herrn Weng Tan, die mir sehr hilfsbereit zur Seite standen und ein angenehmes Arbeitsklima geschaffen haben. Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitern der Pathologie, insbesondere Herrn Dr. Anska Schmidt, den ich bezüglich Fehlerquellen beim Westernblot jederzeit fragen konnte und den MTAs, die mir die Möglichkeit gaben, die Gelelektrophorese-Geräte auszuleihen.

Herrn George Jacoub, Ingenieur und Doktorand an der Universität Stuttgart möchte ich danken für die Hilfe beim Umgang mit dem Graphik-Computerprogramm, wodurch es mir erleichtert wurde, die schriftliche Arbeit dementsprechend zu gestalten und die Ergebnisse eindrucksvoll darzustellen.

Besonderen Dank gilt meinen Eltern, vor allem meinem Vater, der mich davon überzeugt hat, noch die letzten Versuche durchzuführen, um unbedingt diese Arbeit zu Ende zu bringen und ebenso auch für den zur Verfügung gestellten Laptop und das Korrekturlesen, für das ich auch meinem Bruder Jan danken möchte.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

*Aktivitätsverhalten von ERK1 und 2 in MG-63 Osteosarkomzellen  
unter dem Einfluss von Inhibitoren bei mechanischer Belastung*

im Labor für experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter Leitung von  
Herrn Prof. Dr. David B. Jones

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

**Cornelia Westrich**

**Warmbronn, Mai 2006**





